

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA APPLICATA  
XVIII CICLO**

**Ruolo svolto dai mitocondri subsarcolemmatici ed  
intermiofibrillari del muscolo scheletrico  
in risposta a differenti stati nutrizionali**

*Coordinatore*  
Ch.mo Prof.  
MAURILIO DE FELICE

*Candidata*  
Dott.ssa  
ROSARIA TASSO

*Docente Tutore*  
Ch.ma Prof.ssa  
GIOVANNA LIVERINI

## **INDICE**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUZIONE</b>   | <b>1</b>  |
| Stato nutrizionale ed efficienza metabolica   | <b>2</b>  |
| La termogenesi adattativa durante il recupero di grasso   | <b>8</b>  |
| Significato biologico del duplice sistema di controllo della termogenesi adattativa                   | <b>13</b> |
| Fisiopatologia del recupero di peso   | <b>15</b> |
| Respirazione ed efficienza mitocondriale  | <b>20</b> |
| La conduttanza protonica mitocondriale  | <b>28</b> |
| I mitocondri sono una permanente fonte delle specie reattive dell'ossigeno                            | <b>41</b> |
| Danni causati dai radicali liberi a livello mitocondriale   | <b>43</b> |
| Sistemi di difesa dai radicali liberi   | <b>47</b> |
| Popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico: mitocondri subsarcolemmatici ed intermiofibrillari | <b>49</b> |
| <b>SCOPO DELLA TESI</b>   | <b>53</b> |
| <b>PARTE SPERIMENTALE</b>   | <b>62</b> |
| Animali e disegno sperimentale 1: 24 ore di digiuno   | <b>63</b> |
| Animali e disegno sperimentale 2: restrizione calorica  | <b>63</b> |
| Animali e disegno sperimentale 3: rialimentazione   | <b>65</b> |
| Bilancio energetico   | <b>66</b> |
| Misura della composizione corporea  | <b>68</b> |
| Preparazione dei mitocondri subsarcolemmatici e intermiofibrillari dal muscolo scheletrico            | <b>70</b> |
| Dosaggio proteico   | <b>73</b> |
| Misura dell'attività respiratoria sui mitocondri isolati  | <b>73</b> |

|  |     |
|--|-----|
| Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati                               | 75  |
| Misura della conduttanza protonica basale  | 77  |
| Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi                          | 79  |
| Misure del contenuto di ANT  | 80  |
| Misura del coefficiente di accoppiamento termodinamico e dell'efficienza termodinamica | 80  |
| Misura del contenuto di UCP3 nei mitocondri isolati                                    | 83  |
| Determinazione della massa proteica mitocondriale                                      | 84  |
| Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale                              | 86  |
| Determinazione dell'attività della superossido dismutasi                               | 88  |
| Determinazione dei livelli plasmatici di NEFA  | 90  |
| Determinazione dei livelli plasmatici di glucosio e insulina                           | 91  |
| Analisi statistica   | 93  |
| <b>RISULTATI</b>   | 94  |
| Disegno sperimentale 1: 24h di digiuno   | 95  |
| Disegno sperimentale 1: restrizione calorica   | 98  |
| Disegno sperimentale 1: rialimentazione  | 102 |
| <b>DISCUSSIONE</b>   | 137 |
| Disegno sperimentale 1: 24h digiuno  | 138 |
| Disegno sperimentale 2 e 3: restrizione calorica e rialimentazione                     | 146 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>  | 157 |
| Bibliografia consultata  | 158 |
| Bibliografia citata  | 165 |



# **INTRODUZIONE**

## **Stato nutrizionale ed efficienza metabolica**

Le funzioni essenziali delle cellule e degli organi si basano su un apporto esterno di energia, che è fornito da alcuni costituenti dei cibi, come carboidrati, lipidi e proteine. L'energia estratta da questi substrati serve a soddisfare il fabbisogno energetico degli organi.

In un adulto normale il cervello contribuisce per circa il 20% alla spesa energetica a riposo, il muscolo scheletrico il 18-22%, i muscoli addominali circa il 25%, il cuore circa l'11% ed infine il fegato circa il 20%. Durante la giornata, la richiesta energetica, nei diversi tessuti, può variare. Per esempio, con l'esercizio fisico, la richiesta energetica del muscolo scheletrico aumenta, durante un pasto, gli organi addominali richiedono più energia per la digestione e l'assorbimento, infine l'organismo di un bambino richiede energia in più per la crescita.

In circolo vi sono substrati metabolici come glucosio, corpi chetonici, acidi grassi e amminoacidi e la loro concentrazione nel sangue varia, e in ogni momento dipende dallo stato di alimentazione dell'individuo, dalla quantità di substrati depositati e dalla richiesta energetica corporea.

Quando tutti i nutrienti introitati durante un pasto sono stati digeriti, assorbiti e distribuiti alle cellule, la concentrazione plasmatica di glucosio

comincia a scendere. Questo è il passaggio da una condizione di sazietà o postprandiale ad una condizione di digiuno o stato postassorbitivo.

Nello stato postassorbitivo è necessario mantenere le concentrazioni plasmatiche di glucosio in un campo di valori accettabili, per assicurare un adeguato apporto energetico al sistema nervoso. Il fegato è la principale fonte di glucosio in tale condizione. Contemporaneamente, il tessuto adiposo catabolizza i trigliceridi in acidi grassi e glicerolo. Il glicerolo raggiunge il fegato dove viene convertito in glucosio, mentre gli acidi grassi sono utilizzati principalmente sia dal fegato, sia dal muscolo per ottenere energia (ATP). Gli acidi grassi vanno incontro ad un processo di  $\beta$ -ossidazione e vengono scissi in unità a due atomi di carbonio, che poi entrano nel ciclo di Krebs sotto forma di acetil-CoA.

Nello stato di digiuno, la regolazione delle vie biochimiche del metabolismo è principalmente sotto il controllo del sistema endocrino e dipende in larga parte dal rapporto tra insulina e glucagone, ormoni secreti dal pancreas endocrino. Questi ormoni agiscono in antagonismo per mantenere le concentrazioni plasmatiche del glucosio a livelli accettabili.

In una condizione di sazietà, quando l'organismo assorbe nutrienti, l'insulina è dominante e nell'organismo predominano i processi anabolici. Il glucosio ingerito è usato per la produzione di energia e quello in eccesso è accumulato come glicogeno attraverso la glicogenosintesi. Gli

amminoacidi sono indirizzati principalmente verso la sintesi proteica e i trigliceridi depositati nel tessuto adiposo.

In condizioni di digiuno, l'obiettivo della regolazione metabolica è impedire la diminuzione della concentrazione plasmatica di glucosio (ipoglicemia). Infatti a digiuno, predomina il glucagone e si ha l'attivazione della glicogenolisi, gluconeogenesi e chetogenesi.

E' interessante considerare che nella condizione di digiuno o di limitato apporto di nutrienti, come per la restrizione calorica, oltre agli adattamenti di tipo biochimico, si hanno anche degli adattamenti per limitare la spesa energetica, in modo da garantire la sopravvivenza per un periodo il più lungo possibile. Si assiste, infatti, alla riduzione della velocità del metabolismo totale corporeo del 20% circa [Dulloo AG e Jacquet S, 1998; Iossa S et al, 1992]. Inoltre, è stato mostrato che la diminuzione della spesa energetica persiste anche quando si verifica rialimentazione dopo un periodo di restrizione calorica [Dulloo AG e Girardier L, 1990]. A conferma di ciò, è ben noto che la perdita di peso durante il digiuno è accompagnata da una diminuzione della velocità metabolica a riposo maggiore di quella che ci si aspetterebbe dalla variazione del peso e della composizione corporea [Dulloo AG e Jacquet S, 1998]. Questa deviazione dai valori attesi della diminuzione della velocità metabolica basale è in genere ritenuta il risultato di un processo regolato, che per fronteggiare il



deficit di energia introdotta, aumenta l'efficienza metabolica riducendo la termogenesi e quindi riducendo la velocità con cui le riserve tissutali sono consumate [Dulloo AG e Jacquet S, 1998].

È noto che tale soppressione della termogenesi, osservata in uno stadio relativamente precoce nel corso del digiuno, è principalmente sotto il controllo del sistema nervoso simpatico (SNS) e si ritiene sia dettata da segnali innescati in funzione diretta del deficit di energia nutrizionale [Landsberg L et al, 1984 (a)].

Inoltre, la comune osservazione che nei periodi di rialimentazione che seguono periodi di digiuno o di restrizione calorica il grasso sia accumulato prima del tessuto magro suggerisce la possibilità che:

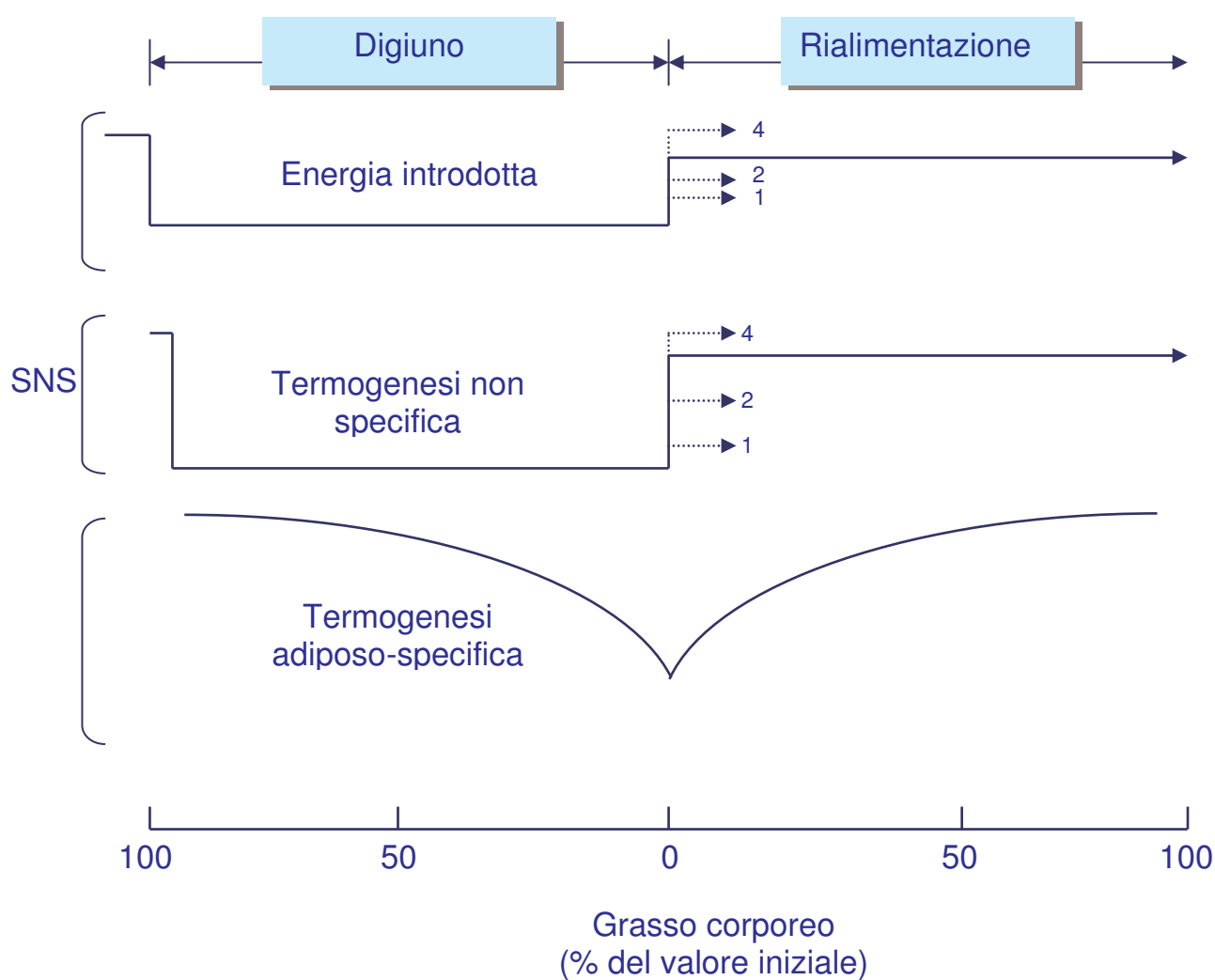
- una componente della riduzione della termogenesi durante la perdita di peso è dettata anche da segnali generati specificamente in risposta al consumo delle riserve di grasso;
- questa componente della riduzione adattativa della termogenesi, che persiste durante il recupero di peso, ha lo scopo di accelerare la ricostituzione delle riserve di grasso.

La riduzione adattativa della termogenesi in risposta al digiuno e alla rialimentazione può quindi pensarsi costituita da due distinti sistemi di controllo, come descritto in *figura 1*. Un primo sistema di controllo, funzione diretta delle variazioni dell'apporto di energia, risponde con

relativa rapidità al deficit energetico. I suoi meccanismi effettori sono soppressi precocemente durante il corso del digiuno, e con la rialimentazione vengono ristabiliti rapidamente in funzione della nuova disponibilità di energia, e in seguito possono essere ulteriormente stimolati se si verifica iperfagia durante la rialimentazione, cosa che potrebbe contribuire ad un aumento della termogenesi indotta dalla dieta (DIT) [Ashworth A, 1969]. Dal momento che l'attività del ramo efferente di tale sistema di controllo, essenzialmente sotto il controllo del SNS, risulta essere modulato non solo dall'apporto energetico della dieta, ma anche da una varietà di altri fattori ambientali come la composizione della dieta, la mancanza di specifici nutrienti, la temperatura ambientale, stress fisiologici [Landsberg L et al, 1984 (b)], tale fenomeno è denominato “*sistema di controllo non-specifico della termogenesi*”. Al contrario, l'altro sistema di controllo ha una costante di tempo maggiore, in quanto risponde solo a segnali provenienti dalle riserve di grasso; è quindi denominato “*controllo adiposo-specifico della termogenesi*” [Dulloo AG e Jacquet J, 2001].

**Figura 1**

**La riduzione adattativa della termogenesi in risposta al digiuno e alla rialimentazione: i due sistemi di controllo**



I livelli 1-4 durante la rialimentazione corrispondono a differenti introiti calorici: l'energia introdotta ai livelli 1 e 2 risulta inferiore a quella precedente al digiuno, mentre quella a livello 4 è superiore

## **La termogenesi adattativa durante il recupero di grasso**

Più dirette evidenze dell'esistenza di una soppressione adiposo specifica della termogenesi, il cui ruolo è quello di accelerare specificamente il recupero di grasso corporeo, può derivare da studi del bilancio energetico in animali da laboratorio che recuperano peso dopo il semidigiuno. Se i ratti sottoposti a restrizione calorica vengono rialimentati con la stessa quantità di cibo dei controlli dello stesso peso, la velocità della deposizione delle proteine risulta essere la stessa dei controlli, mentre la velocità di deposizione dei grassi aumenta di circa 2 volte come risultato di una spesa energetica più bassa del 10-15%, durante le prime due/tre settimane di rialimentazione isoenergetica [Dulloo AG e Jacquet J, 2001]. Molti fattori che possono teoricamente contribuire a questa differenza nell'energetica tra i ratti rialimentati ed i controlli (differenza di età, attività fisica e tipo di dieta) hanno in realtà un minimo impatto sulla differenza della spesa energetica fra i due gruppi [Dulloo AG e Girardier L, 1990]. Di conseguenza, nelle condizioni di rialimentazione, la spesa energetica più bassa nei ratti rialimentati rispetto a quella dei controlli è essenzialmente un'energia risparmiata come risultato di una sostenuta soppressione della termogenesi allo scopo di riacquistare grasso.

Il fatto che, quando sia i ratti rialimentati sia i controlli vengono iso-alimentati durante l'esposizione a freddo (uno stato di elevata attivazione simpatica della termogenesi), gli animali rialimentati mostrano ancora la capacità di conservare energia per accumulare grasso [Dulloo AG et al, 1995], suggerisce che i meccanismi che controllano la soppressione adiposo-specifica della termogenesi sono chiaramente distinti dal controllo simpatico della termogenesi. In altre parole, il fatto che durante il recupero di peso la soppressa termogenesi adiposo-specifica (conservazione di energia) può coesistere con una stimolata termogenesi mediata dal simpatico (dissipazione di energia), in risposta a stimoli di freddo [Dulloo AG et al, 1995], iperfagia [Dulloo AG e Girardier L, 1993], diete povere di proteine [Dulloo AG e Girardier L, 1992], o infezioni [Arsenijevic D et al, 1997], suggerisce che questi due sistemi di controllo hanno siti effettori distinti e il controllo della termogenesi adiposo-specifico avviene in siti diversi da quelli reclutati dal SNS in risposta alla dieta e al freddo. Sulla base di studi della cinetica della velocità di turnover della norepinefrina in diversi organi e tessuti [Landsberg L e Young JB, 1978] (*tabella 1*) si può postulare che il meccanismo alla base del controllo non specifico della termogenesi opera in tessuti ed organi metabolicamente molto attivi (come il fegato, i reni, il cuore e il tessuto adiposo bruno) ed è rapidamente ristabilito in seguito ad una nuova disponibilità di cibo.

**Tabella 1**

**Eterogeneità dell'attività del sistema nervoso simpatico in risposta alla  
dieta e alla temperatura ambientale nel ratto**

| <b>Stimolo</b>             | <b>Freddo</b><br><b>(6°C vs 22°C)</b> | <b>Cibo</b><br><b>(normali vs digiuno)</b> |
|----------------------------|---------------------------------------|--|
| <b>Cuore</b>               | ↑                                     | ↑  |
| <b>Pancreas</b>            | ↑                                     | ↑  |
| <b>Fegato</b>              | 0                                     | ↑  |
| <b>Rene</b>                | 0                                     | ↑  |
| <b>BAT</b>                 | ↑                                     | ↑  |
| <b>WAT</b>                 | ↑                                     | ↓  |
| <b>Muscolo scheletrico</b> | 0                                     | 0  |

BAT: tessuto adiposo bruno.

WAT: tessuto adiposo bianco.

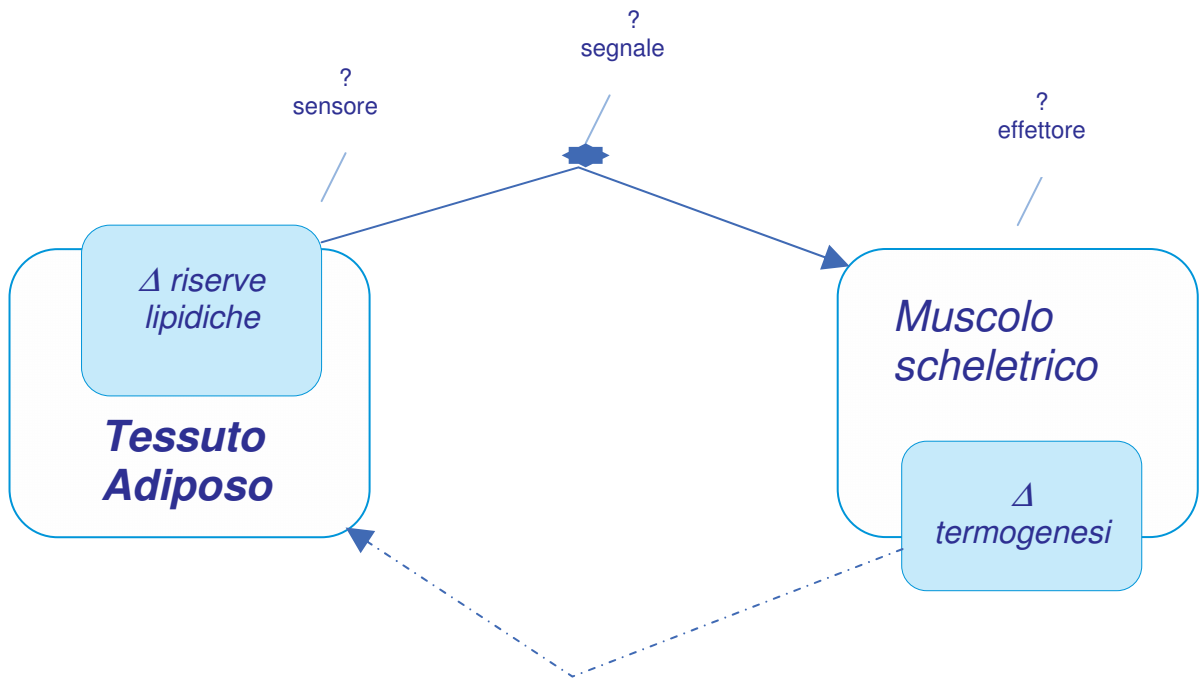
Le frecce rivolte verso l'alto o verso il basso indicano l'aumento o la diminuzione dell'attività del SNS; il simbolo zero indica che non vi sono cambiamenti significativi

Al contrario, il meccanismo alla base del controllo adiposo specifico della termogenesi opera soprattutto nel muscolo scheletrico, un tessuto già conosciuto come importante sito della soppressione della termogenesi indotta dal digiuno, come osservato da studi di circolazione regionale di sangue mediante microsfele, accoppiato con misure di consumo di ossigeno artero-venoso [Ma SWY e Foster DO, 1986]. Come descritto in *figura 2*, tale sistema potrebbe comprendere uno o più sensori dello stato di deplezione dei depositi di grasso, uno o più segnali che innescano la soppressione della termogenesi in funzione dello stato di riduzione dei depositi di grasso e un sistema effettore che media la termogenesi adattativa nel muscolo scheletrico.

Fino ad oggi, comunque, gli studi di digiuno prolungato e di rialimentazione hanno indicato che nè i livelli circolanti di acidi grassi liberi (FFA) né la leptina mostrano variazioni temporali correlate con la cinetica della soppressione della termogenesi adiposo-specifica [Samec S et al, 1997]. Attenendoci alle conoscenze attuali, i sensori, i segnali e il sistema effettore del controllo della termogenesi adiposo-specifica rimangono sconosciuti.

**Figura 2**

**Controllo adiposo-specifico della termogenesi: segnali tra organi**





## **Significato biologico del duplice sistema di controllo della termogenesi adattativa**

Durante il digiuno, il controllo della ripartizione determina la relativa proporzione di proteine e grassi da mobilitare come carburante per il corpo e l'energia conservata dovuta ad una soppressione della termogenesi è diretta a ridurre lo sbilancio energetico, con il netto risultato che c'è una diminuzione della velocità di mobilitazione di proteine e grassi nella stessa proporzione definita dalla ripartizione individuale dell'energia. Infatti, il fatto che in uomini con peso normale la frazione di energia derivata dalle proteine rimanga la stessa durante il corso di un digiuno prolungato [Henry CJK et al, 1988] implica che il sistema di controllo della soppressione della termogenesi non è diretto a risparmiare proteine né specificatamente grassi, ma a risparmiare sia proteine che grassi. Durante il digiuno, inoltre, il ruolo funzionale di entrambi i sistemi di controllo della soppressa termogenesi è di ridurre la velocità totale di utilizzo dei substrati energetici.

Durante la rialimentazione, il controllo della ripartizione opera in modo tale che proteine e lipidi siano depositati nella stessa relativa proporzione determinata dalle caratteristiche di ripartizione individuali che c'erano durante il digiuno, e fa sì che l'aumentata disponibilità di cibo porti alla rapida eliminazione della soppressione della termogenesi non specifica

(mediata dal SNS). Al contrario, la soppressione della termogenesi dovuta al controllo adiposo specifico è eliminata più lentamente in funzione del recupero di grasso, in modo tale che l'energia che continua ad essere risparmiata è diretta specificamente a ricostituire i depositi di grasso.

Un tale fenomeno adattativo che accelera la ricostituzione dei depositi di grasso piuttosto che convogliare l'energia risparmiata verso un incremento compensatorio della sintesi corporea di proteine (un processo energeticamente costoso), potrebbe avere un significato di sopravvivenza nello stile di vita ancestrale caratterizzato da un'alternanza tra carestie e periodi di elevata disponibilità di cibo. In virtù del fatto che il grasso corporeo ha una maggiore densità energetica e un più basso costo di sintesi e di mantenimento rispetto alle proteine, esso potrebbe consentire all'organismo una più alta capacità di ricostituire rapidamente una riserva energetica efficiente e quindi di ottimizzare la sua capacità di sopravvivenza di fronte ad un'eventuale carenza di cibo. Ugualmente importante per la sopravvivenza dei mammiferi durante il recupero del peso è la necessità di mantenere la capacità di aumentare la produzione di calore (la termogenesi) in risposta a diversi stress ambientali quali:

- aumentati bisogni termoregolatori durante il recupero di peso in ambienti freddi;
- generazione di febbre durante l'esposizione a infezioni;

- aumentata produzione di calore come adattamento a diete carenti.

Questi sistemi di controllo della termogenesi differentemente regolati potrebbero essersi affermati durante il corso dell'evoluzione dei mammiferi come un duplice processo adattativo in grado di soddisfare le necessità della conservazione di energia diretta specificamente al recupero dei grassi persino in presenza di stress ambientali, quando l'attivazione della produzione di calore mediata dal simpatico è ugualmente importante per la sopravvivenza.

### **Fisiopatologia del recupero di peso**

Il fenomeno della termogenesi soppressa durante il recupero del peso è generalmente considerato un adattamento fisiologico, che permette ai mammiferi di riacquistare il loro peso normale dopo un periodo di digiuno. Vi è però uno stretto collegamento tra tale termogenesi soppressa a diversi stati patologici, come l'obesità, il diabete e malattie cardiovascolari [Rich-Edwards JW et al, 1997; Eriksson JG et al, 1999; Schroeder DG, 1999; Cianfarani S et al, 1999; Huxley RR et al, 2000; Ong KKL et al, 2000; Roseboom TJ et al, 2001; Victora CG e Barros FC, 2001]. La possibilità di contrarre tali malattie aumenta notevolmente nel corso di una rialimentazione isoenergetica con una dieta ad alto contenuto di grassi. Ciò sottolinea come in risposta ai nostri moderni pasti grassi l'attuazione di una reazione fisiologica adattativa in risposta ad un calo dei depositi di grasso è

spinta oltre i limiti per i quali era stata progettata, per consentire la sopravvivenza in condizioni di diete povere di grasso. In pratica, l'aumento del contenuto lipidico della dieta ha compromesso un complesso sistema omeostatico. Uno schema del meccanismo con il quale l'esasperata soppressione adiposo-specifica della termogenesi durante il recupero di peso può essere implicata nella transizione da uno stato fisiologico normale ad uno stato fisiopatologico è presentato in *figura 3*.

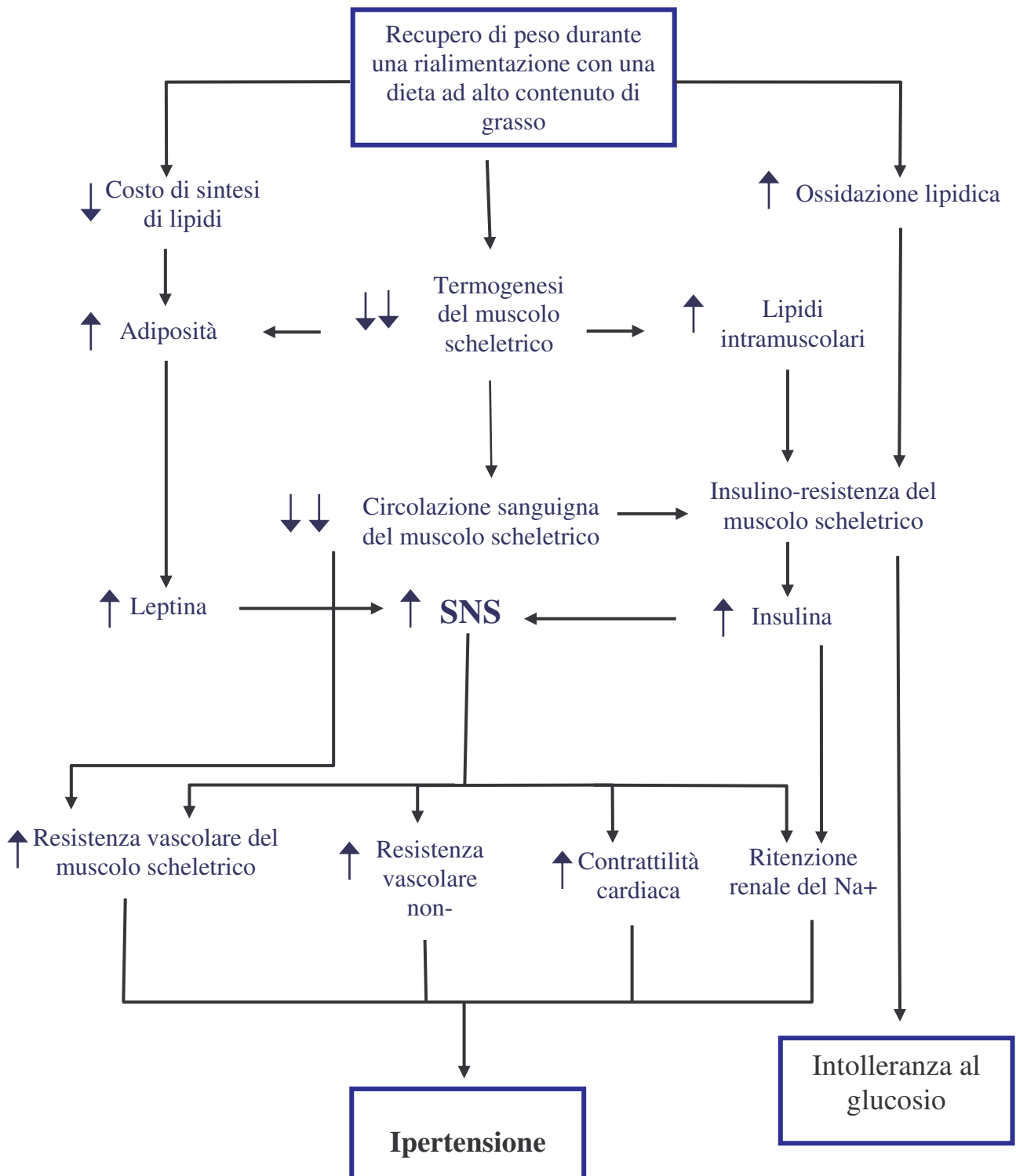
1. Lo schema è centrato sul fatto che la soppressione della termogenesi adiposo-specifica ha luogo soprattutto nel muscolo scheletrico.
2. Durante una rialimentazione isoenergetica con una dieta a basso contenuto di grassi la termogenesi soppressa del muscolo scheletrico si traduce in una diminuita attività metabolica e quindi in una minore circolazione di sangue in questo tessuto, ma non a livelli tali da portare disparità nel metabolismo dei substrati né nell'omeostasi della pressione ematica.
3. Durante la rialimentazione isoenergetica con una dieta ad alto contenuto di grassi, invece, l'esagerata soppressione della termogenesi può portare ad una cattiva omeostasi del glucosio e a rischi di ipertensione. Innanzitutto, un'esagerata riduzione della circolazione sanguigna, un eccesso di acidi grassi liberi circolanti e un accumulo di grasso nel muscolo scheletrico (con conseguente lipotossicità) sono tutti fattori

implicati nello sviluppo della resistenza all'insulina del muscolo scheletrico, che l'organismo prova a compensare attraverso un incremento della produzione di insulina. Inoltre, una iper-soppressione della termogenesi del muscolo scheletrico insieme con il basso costo di sintesi di grasso durante la rialimentazione con una dieta ad alto contenuto di grassi, portano ad un eccesso di adiposità e probabilmente ad un incremento della produzione di leptina. Le risultanti condizioni di iper-insulinemia ed iper-leptinemia rappresentano condizioni di stimolazione dell'attività del SNS e possono quindi portare ad un aumento della resistenza vascolare (inclusa una vasocostrizione muscolare), della contrattilità cardiaca e della ritenzione di sodio, che possono esasperare lo stato di resistenza all'insulina e i rischi di ipertensione. Inoltre, mentre l'esagerata riduzione della circolazione sanguigna nel muscolo scheletrico può contribuire direttamente ad aumentare la resistenza vascolare in questo tessuto, un aumento di insulina può anche esercitare effetti diretti sui tubuli renali e quindi contribuire alla ritenzione di sodio, con conseguenze sulla regolazione della pressione sanguigna [Landsberg L, 1986]. In questo contesto, un'esasperazione della soppressione adiposo-specifica della termogenesi indotta da una elevata percentuale di grassi nella dieta può quindi essere considerato come evento primario che conduce

all'eccesso di adiposità, alla resistenza all'insulina ed eventualmente all'ipertensione.

**Figura 3**

**Ruolo centrale della soppressione della termogenesi del muscolo scheletrico nella patogenesi di ipertensione ed intolleranza al glucosio**



## **Respirazione ed efficienza mitocondriale**

Un organismo particolarmente efficiente da un punto di vista metabolico è in grado certamente di sopravvivere più a lungo nei periodi di carestia, ma è anche quello che accumula facilmente tessuto adiposo in un periodo di grande abbondanza di cibo. L'efficienza metabolica può essere definita come una misura dell'entità con cui l'organismo ottiene energia, sotto forma di composti ad elevato contenuto energetico (ATP), dai nutrienti che introduce con l'alimentazione. Il grado di efficienza metabolica potrebbe, quindi, giustificare la naturale tendenza di alcuni organismi di accumulare grasso più facilmente di altri. Questi organismi sono anche quelli che più facilmente sopravvivono in condizioni di prolungato digiuno.

I meccanismi che concorrono alla regolazione dell'efficienza metabolica, in genere, sono poco conosciuti. I cambiamenti della spesa energetica a livello dell'organismo in "toto" riflettono paralleli cambiamenti a livello di quegli organi e tessuti, che maggiormente contribuiscono alla velocità metabolica corporea. A livello cellulare, variazioni dell'efficienza energetica mitocondriale nei vari tessuti possono, senz'altro, contribuire alle variazioni dell'efficienza metabolica corporea. Quindi, in condizioni particolari in cui è diminuita la spesa energetica, quali il digiuno, la restrizione calorica e la rialimentazione dopo un periodo di restrizione calorica, la comprensione dei meccanismi di regolazione dell'efficienza



mitocondriale può essere di primaria importanza per capire sia la modulazione dell'efficienza metabolica dell'intero organismo, sia particolari fenomeni indotti da tali stimoli fisiologici nei vari organi.

I mitocondri, presenti in tutte le cellule eucariotiche, sono organelli circondati da membrane che convertono l'energia in forme utili a promuovere le reazioni cellulari. Con la respirazione mitocondriale, la cellula opera l'ossidazione completa dei substrati organici a spese dell'ossigeno fino ad anidride carbonica ed acqua, ricavandone energia. La respirazione in senso stretto consiste nel ciclo dell'acido citrico o ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA), le cui reazioni avvengono nella matrice mitocondriale, e nel trasporto degli elettroni lungo la catena respiratoria, associata alla membrana interna del mitocondrio. La membrana interna è altamente specializzata. Essa contiene un'alta proporzione del fosfolipide «doppio» cardiolipina, che è costituito da quattro acidi grassi e può aiutare a rendere la membrana particolarmente impermeabile agli ioni. Essa contiene anche una varietà di proteine di trasporto che la rendono selettivamente permeabile a quelle piccole molecole che sono metabolizzate o richieste dai molti enzimi mitocondriali concentrati nello spazio della matrice.

Nel processo respiratorio mitocondriale viene utilizzato principalmente piruvato che si forma nella glicolisi, ma possono essere utilizzati molti altri

acidi organici e in particolare il malato, chetoacidi derivanti dalla deaminazione degli amminoacidi, gli amminoacidi derivanti dalla idrolisi delle proteine o gli acidi grassi derivanti dall'idrolisi dei lipidi. Il piruvato e gli acidi grassi sono trasportati selettivamente dal citosol nella matrice mitocondriale, dove sono demoliti nei gruppi acetile a due atomi di carbonio dell'acetil-CoA; il gruppo acetile entra poi nel ciclo dell'acido citrico per essere ossidato ulteriormente. I prodotti finali principali di questa ossidazione sono  $\text{CO}_2$ , che è rilasciata dalla cellula come prodotto di rifiuto, nicotinamide adenin dinucleotide ridotto o NADH, che è la fonte principale di elettroni per il trasporto lungo la catena respiratoria. Poiché tale trasporto di elettroni avviene secondo la scala di potenziale redox e, dunque, secondo un gradiente energetico favorevole, ad esso possono essere accoppiate le reazioni di sintesi di adenosinatrifosfato o ATP (*fosforilazione ossidativa*).

Gli enzimi della catena respiratoria sono immersi nella membrana mitocondriale interna, che è in genere molto convoluta, e forma una serie di ripiegamenti, noti come creste, nello spazio della matrice.

Il significato metabolico del ciclo dell'acido citrico è l'estrazione di elettroni ad alta energia tramite l'ossidazione del gruppo acetile a  $\text{CO}_2$ . Questi elettroni sono trasferiti a due coenzimi NAD e FAD (flavin adenin dinucleotide) o accettori redox che sono ridotti a NADH e  $\text{FADH}_2$  prodotto

dalla succinico deidrogenasi. Ciò consente alla cellula di recuperare sotto forma di potenziale redox buona parte dell'energia già contenuta nelle molecole dei substrati organici. Attraverso la catena di trasporto degli elettroni viene rimossa una coppia di elettroni dal NADH o dal FADH<sub>2</sub> riducenti ad alta energia, per essere avviata lungo una sequenza di componenti-trasportatori, i cui valori di potenziale redox diventano progressivamente più positivi fino all'ossigeno che, accettando gli elettroni, si riduce ad acqua. Quindi la membrana interna partecipa attivamente al processo di trasduzione dell'energia con la sua permeabilità selettiva agli ioni, permettendo la creazione di un gradiente di potenziale elettrochimico dei protoni fra la matrice mitocondriale e lo spazio intermembrana.

Secondo l'ipotesi chemiosmotica, durante il trasporto degli elettroni ad alta energia dagli idrogeni del NADH e del FADH<sub>2</sub> lungo la catena respiratoria fino alla membrana mitocondriale interna, l'energia rilasciata nel passaggio da un trasportatore al successivo è usata per pompare protoni (H<sup>+</sup>) attraverso la membrana interna dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana (*figura 4*). Ciò crea un gradiente elettrochimico protonico attraverso la membrana mitocondriale interna e il flusso di ritorno di H<sup>+</sup> lungo questo gradiente viene a sua volta usato per attivare l'enzima legato alla membrana, ATP sintetasi, che catalizza la conversione di ADP+P<sub>i</sub>

(adenosina difosfato e fosfato inorganico) ad ATP, completando il processo della fosforilazione ossidativa.

L'ATP sintetasi si comporterebbe, dunque, come una permeasi protonica che tende a riequilibrare il gradiente elettrochimico dei protoni fra i due lati della membrana, trasducendo così l'energia del gradiente in energia conformazionale e, quindi, in energia di legame chimico dell'ATP. L'ATP prodotto dalla fosforilazione all'interno dei mitocondri esce dal mitocondrio grazie all'enzima traslocasi dei nucleotidi adeninici (ANT) inserito nella membrana mitocondriale interna, che catalizza lo scambio con un ADP citosolico entrante nel mitocondrio [Kim JM et al, 1988]. Il trasferimento degli  $H^+$ , attraverso la membrana interna, dallo spazio della matrice allo spazio intermembrana ha come conseguenza la formazione di due tipi di gradienti:

1. un gradiente di pH ( $\Delta pH$ ) attraverso la membrana mitocondriale interna, con il pH della matrice più alto (basico) di quello dello spazio intermembrana;
2. un gradiente di voltaggio ( $\Delta V$ ) (o potenziale di membrana,  $\Delta \psi$ ) derivante dal flusso netto di ioni positivi verso l'esterno, per cui la membrana interna risulterà carica positivamente all'esterno e negativamente all'interno.

Queste due grandezze ( $\Delta pH$  e  $\Delta\psi$ ) determinano la forza motrice dei protoni, il cosiddetto *gradiente protonico elettrochimico* ( $\Delta p$ ). Tale gradiente elettrochimico di  $H^+$  è quindi la forza spingente per la sintesi di ATP.

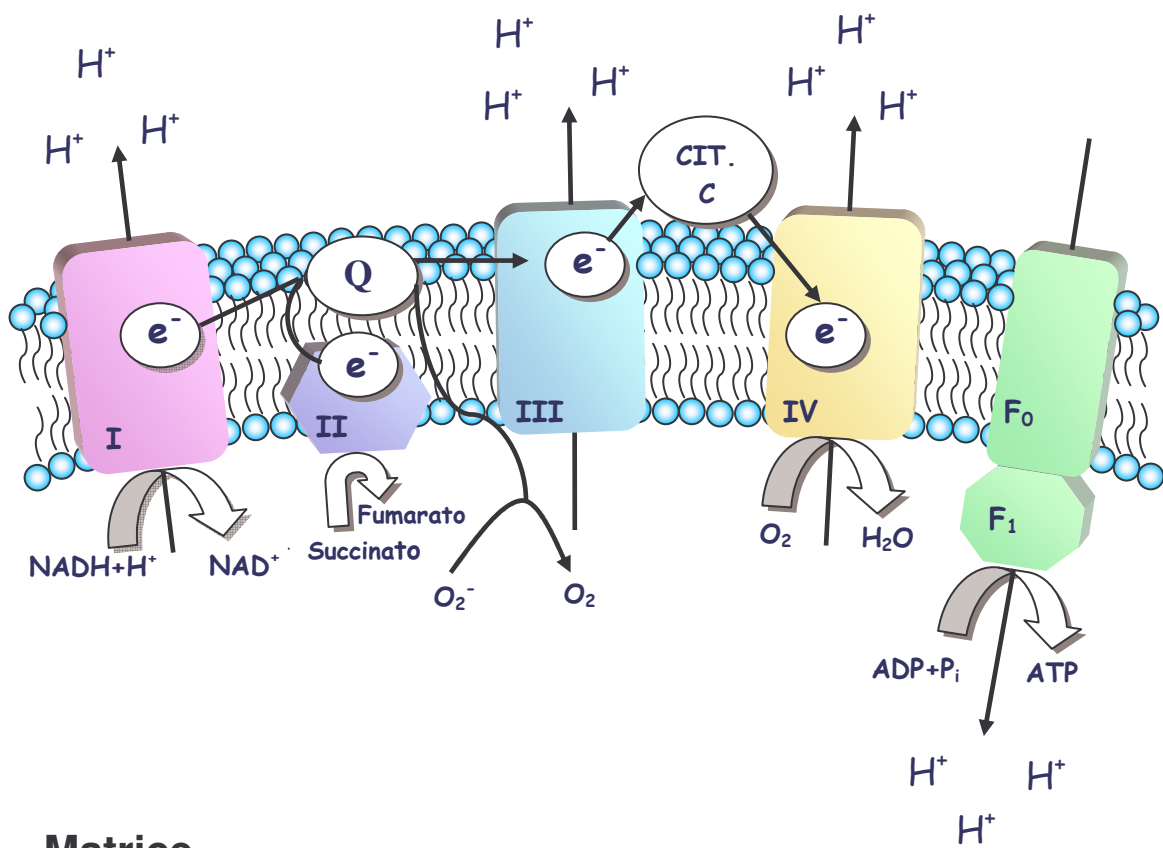
Nel processo di fosforilazione della catena respiratoria, l'ADP e il fosfato sono dei reagenti necessari per il trasporto degli elettroni dal NADH all'ossigeno. Infatti, il trasporto degli elettroni procede alla massima velocità nei mitocondri isolati soltanto quando fosfato e ADP sono presenti nel mezzo in cui sono sospesi in quantità saturanti. In assenza di ADP, la velocità della respirazione è molto bassa e non avviene alcuna fosforilazione poiché non vi è accettore per il fosfato, e naturalmente, non vi è sintesi di ATP. Questa condizione nota come *Stato 4* della respirazione, è lo stato di riposo della respirazione. Se ad un sistema isolato di mitocondri allo Stato 4 si aggiunge una quantità saturante di ADP, il consumo di ossigeno aumenta bruscamente fino ad un massimo e contemporaneamente l'ADP aggiunto viene fosforilato ad ATP. Questo è chiamato *Stato 3* o respirazione attiva. Quando tutto l'ADP aggiunto è stato fosforilato, la velocità di consumo dell'ossigeno ritorna allo Stato 4. Questo fenomeno, in cui la velocità di trasporto degli elettroni è controllata dalla concentrazione di ADP, è chiamato controllo da parte dell'accettore o controllo respiratorio. I mitocondri, infatti, hanno un'affinità molto elevata

per l'ADP e continuano a fosforilarlo, purchè siano presenti tutti gli altri componenti necessari, finchè la concentrazione di ADP non diventa molto bassa. Il rapporto o *indice di controllo da parte dell'accettore (RCR)* è il rapporto tra la velocità di respirazione dei mitocondri in presenza di notevoli quantità di ADP e la velocità di respirazione in assenza di ADP. Questo rapporto è normalmente molto alto; può essere di 5 o più nei mitocondri intatti e anche più alto nella cellula intatta. Tuttavia, quando i mitocondri sono danneggiati o preparati meno di recente, perdono la loro capacità di fosforilare ADP e il rapporto scende a 1. In questi mitocondri danneggiati il trasporto degli elettroni avviene alla massima velocità in assenza di ADP. Il rapporto di controllo da parte dell'accettore è un utile misura dell'integrità dei mitocondri isolati: più alto è il rapporto più integri sono i mitocondri.

**Figura 4**

**Catena respiratoria mitocondriale**

*Spazio intermembrana*



## La conduttanza protonica mitocondriale

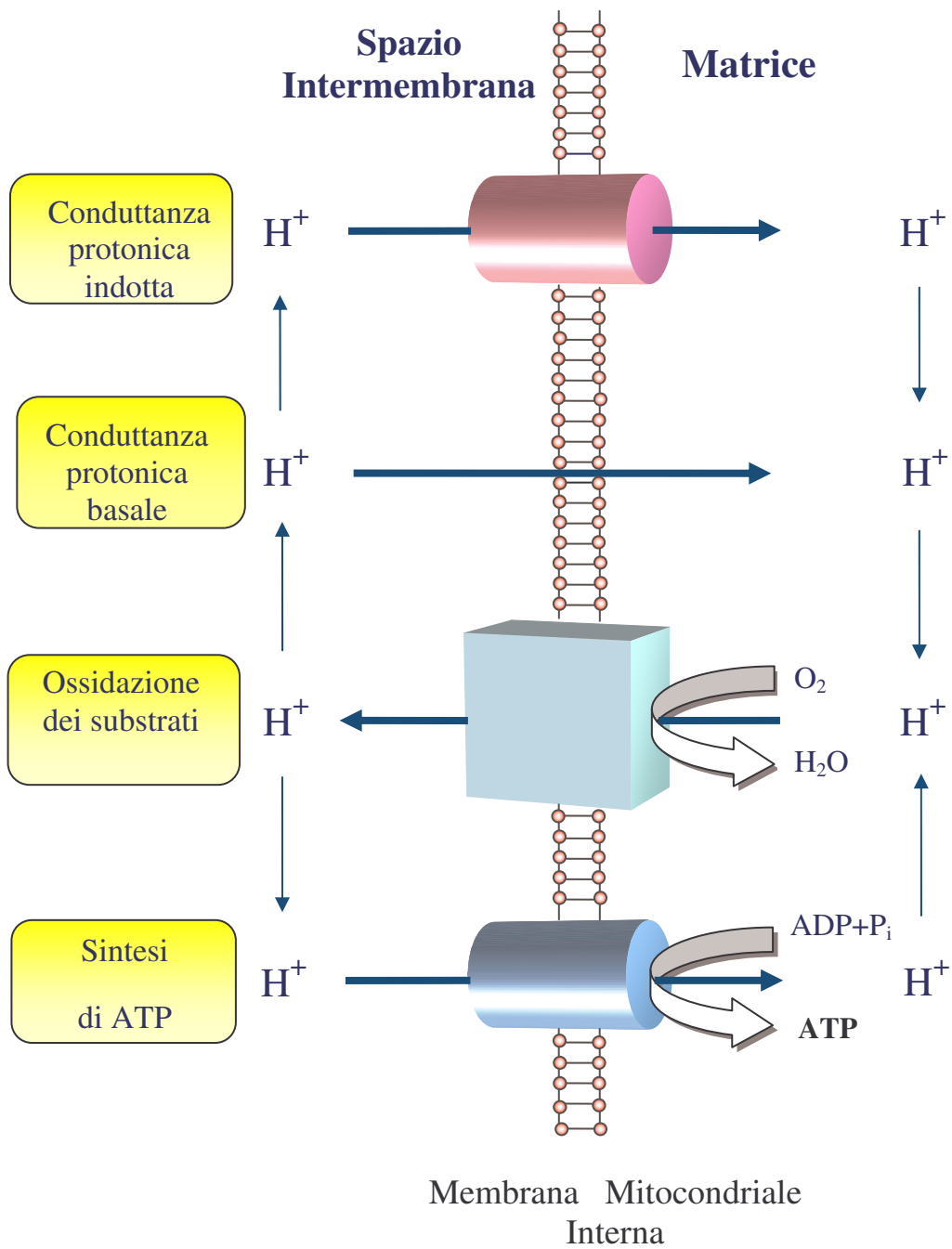
L'efficienza del sistema mitocondriale è influenzata dalle caratteristiche di impermeabilità agli  $H^+$  della membrana mitocondriale interna. Tuttavia, nei mitocondri di tutti i tessuti finora studiati, l'accoppiamento tra l'ossidazione dei substrati e la sintesi dell'ATP non è efficiente al 100% poiché la membrana interna dei mitocondri presenta una perdita protonica passiva chiamata *conduttanza protonica basale* [Nicholls DG, 1974] (figura 5).

La figura 5 mostra i circuiti protonici chemiosmotici lungo la membrana interna dei mitocondri isolati. Quindi, schematizzando, l'ossidazione del substrato consiste nel trasporto del substrato, nel suo metabolismo e nella catena di trasporto degli elettroni. Contemporaneamente a questa si ha un passaggio di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana che dà origine ad un gradiente elettrochimico protonico. Nel circuito in basso, il ritorno dei protoni verso la matrice è accoppiato alla produzione di adenosina trifosfato (ATP) tramite l'ATP sintetasi. I circuiti in alto mostrano il flusso protonico disaccoppiante attraverso la via della conduttanza basale o attraverso la via della conduttanza inducibile (rappresentata da una proteina, come potrebbe essere una proteina disaccoppiante UCP).



**Figura 5**

**Circuiti protonici chemiosmotici lungo la membrana interna di  
mitocondri isolati**



La conduttanza protonica basale non è un artefatto dell'isolamento dei mitocondri, poiché è stato dimostrato che essa è presente anche nei mitocondri di cellule e di organi intatti, come il fegato, i timociti, i linfociti, il muscolo scheletrico ed il cuore [Rolfe DFS e Brand MD, 1996; Challoner DR, 1968].

Diversi studi hanno dimostrato che il contributo della conduttanza protonica basale al consumo di ossigeno può essere molto elevato, con percentuali che oscillano dal 20% al 50%, in tessuti quali il fegato ed il muscolo. In particolare tale contributo è del 20% negli epatociti attivi e del 25% negli epatociti a riposo [Rolfe DFS e Brand MD, 1996; Brand MD et al, 1994]. Nel muscolo di ratto le percentuali sono più elevate: il 35% nel muscolo in contrazione e il 50% nel muscolo a riposo. Nel cuore intatto, in contrazione, è di circa il 12% [Brand MD et al, 1994]. E' stato calcolato, inoltre, che la conduttanza protonica basale utilizza il 20-25% dell'ossigeno totale, necessario per il mantenimento della velocità metabolica basale del ratto [Rolfe DFS e Brand MD, 1996].

La conduttanza protonica basale mitocondriale è presente non solo negli animali omeotermi, ma anche negli eterotermi e nelle piante indicando che tale proprietà è conservata non solo nei differenti tessuti di uno stesso animale o pianta, ma anche tra specie differenti [Laloi M et al, 1997; Stuart JA et al, 1999].

Gli acidi grassi sono dei disaccoppianti naturali della fosforilazione ossidativa nei mitocondri. Nelle cellule intatte e nei tessuti, essi rappresentano un eccellente substrato respiratorio poiché forniscono elettroni alla catena respiratoria. Questa funzione maschera il loro potenziale effetto disaccoppiante che diventa evidente solo in speciali condizioni fisiologiche (digiuno, diete ad alto contenuto di grassi, esercizio eccessivo) o patologiche (diabete) caratterizzate da un inusuale accumulo di acidi grassi [Soboll S et al, 1984]. Il disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi è stato denominato *conduttanza protonica indotta* (figura 5).

Il coinvolgimento degli acidi grassi nell'indurre una variazione dell'accoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale è nota sin dall'inizio del 1950. Infatti alcuni ricercatori avevano notato che tali effetti erano attenuati dalla presenza di albumina di siero bovina (BSA), una molecola che mostra un'alta capacità di legame per gli acidi grassi [Pressman BC e Lardy HA, 1956; Hulsmann WC et al, 1960].

Successivamente si identificò che gli acidi grassi non esterificati a lunga catena (FFA) erano i reali agenti disaccoppianti “naturali” [Wojtczak L, 1976; Wojtczak L e Schönfeld P, 1993] ed in particolare la loro potenzialità dipendeva dalla lunghezza della catena e dal loro grado di insaturazione [Wojtczak L, 1976; Zborowski J e Wojtczak L, 1963].

Gli studi successivi, portarono a concludere che gli FFA hanno apparentemente tre effetti separati:

1. disaccoppiamento della respirazione mitocondriale dalla sintesi di ATP;
2. permeabilizzazione della membrana mitocondriale interna ai soluti;
3. inibizione dell'adenina nucleotide traslocasi (responsabile di una riduzione delle molecole di ADP consumato per ogni ossigeno consumato o rapporto ADP/O).

La differenza fondamentale tra l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi e quella dei classici disaccoppianti sintetici, come l'FCCP e il dinitrofenolo che agiscono da protonofori, è il piccolo effetto degli acidi grassi sul potenziale di membrana. Una possibile spiegazione per quest'ultimo effetto come pure per il decremento del pH mitocondriale è stato suggerito da Wrigglesworth e coll. [Wrigglesworth JM et al, 1993]. Questi ricercatori trovarono che l'oleato può catalizzare il trasporto del  $K^+$  e del  $H^+$  attraverso il doppio strato lipidico con un meccanismo che prevede che l'acido grasso possa traslocare un protone o un catione rispettivamente come acido associato (AH) o come coppia ionica ( $A^-X^+$ ). La direzione del trasporto sarà determinata dalla polarità del gradiente cationico.

La velocità del trasporto dipenderà dalla natura dell'acido grasso e dal particolare catione della coppia ionica. Viene altresì proposto che la velocità di movimento dell'acido indissociato sia più elevata di quella della

coppia ionica e di quella della forma anionica dell'acido grasso dissociato. La presenza di un potenziale di membrana accelererà la traslocazione della specie anionica. Secondo questo meccanismo, quindi, l'effetto disaccoppiante sarebbe la conseguenza di un afflusso di  $H^+$  nella matrice mitocondriale con conseguente diminuzione del potenziale di membrana; in questo modo una parte dell'energia derivata dall'incrementato flusso di elettroni attraverso la catena respiratoria, dovuto agli acidi grassi, sembra essere dissipata con un meccanismo simile al disaccoppiamento.

Studi successivi suggerirono che gli acidi grassi sono in grado di incrementare la conduttanza protonica nei mitocondri, interagendo con alcuni componenti della membrana mitocondriale interna. Infatti il gruppo di Skulachev osservò che l'ADP ed alcuni inibitori dell'adenina nucleotide traslocasi (ANT) erano in grado di abolire parte dell'effetto disaccoppiante del palmitato [Dedukhova VI et al, 1991]. Tali evidenze portarono gli autori ad ipotizzare che l'ANT potesse essere coinvolta nel disaccoppiamento mediato dagli acidi grassi.

In particolare Schönfeld utilizzando uno specifico inibitore dell'attività del carrier ANT, quale la carbossiatrattiloside (CAT), evidenziò una correlazione tra il grado di attivazione del carrier stesso ed il disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi [Schönfeld P, 1990]. Una tale correlazione è stata confermata paragonando la capacità degli acidi grassi

di disaccoppiare i mitocondri che presentavano un differente contenuto di ANT. In particolare, in tale studio è stato evidenziato che il maggior contenuto del trasportatore ed una sua maggiore attività, coincidono con la più alta stimolazione della respirazione nello stato a riposo basale, da parte degli acidi grassi e con una più alta sensibilità alla CAT. D'altra parte, mitocondri isolati da un mutante di lievito che risultava “mancante di ANT”, risultarono essere insensibili al disaccoppiamento dovuto agli acidi grassi [Polčic P et al, 1997].

L'azione protonofora ed ionofora degli acidi grassi è efficientemente impedita da concentrazioni millimolari di ioni  $Mg^{2+}$  nel mezzo esterno; si è ipotizzato [Shinohara Y et al, 1995] che ciò sia dovuto alla formazione del complesso ione magnesio-acidi grassi all'interno della membrana, che rimane così immobilizzato sulla sua superficie.

In genere gli inibitori dell'ANT, quali ad esempio la CAT, non aboliscono completamente l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi a lunga catena, ciò indica che il meccanismo che coinvolge l'ANT non è il solo responsabile della dissipazione del gradiente protonico elettrochimico mitocondriale. Infatti, inibitori e/o substrati di altri due trasportatori mitocondriali quali glutammato/aspartato e dicarbossilato, sono in grado di inibire parte del disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi [Skulachev VP, 1998 (a)].

La natura della conduttanza protonica è stata ben descritta per il tessuto adiposo bruno (BAT).

Il BAT è il sito anatomico maggiormente responsabile dell'alta velocità metabolica riscontrata nei ratti acclimatati al freddo [Rothwell NJ e Stock MJ, 1979; Himms-Hagen J, 1990]. Tale tesi è sostenuta dall'evidenza che il BAT, tessuto pressoché atrofico in condizioni normali, subisce in risposta all'esposizione al freddo e per stimolazione da parte del sistema nervoso simpatico (SNS), ed in particolare della noradrenalina (NA), profonde modificazioni morfologiche e funzionali. Infatti, misurazioni "in vivo" condotte da Foster e Frydman [Foster DO e Frydman ML, 1978] avevano indicato che, a dispetto della sua piccola massa totale (1-2% del peso corporeo nei ratti adattati al freddo), la produzione di calore del BAT sotto l'influenza delle catecolammine giustificava più del 60% dell'alta velocità metabolica dei ratti adattati al freddo.

Nel 1960 è stato mostrato che la conduttanza protonica indotta poteva spiegare l'incrementata attività termogenica del BAT dei roditori, in risposta all'esposizione al freddo e a diete iperlipidiche [Rothwell NJ e Stock MJ, 1979; Himms-Hagen J, 1990]. Questi risultati portarono alla ricerca ed all'identificazione della proteina responsabile della conduttanza protonica nel BAT. Nel 1978, è stato dimostrato che una proteina della membrana mitocondriale, chiamata quindi proteina disaccoppiante (UCP) o

termogenina, ed in seguito rinominata UCP1, era responsabile dell'attività termogenica del BAT [Nicholls DG et al, 1978].

In seguito all'esposizione al freddo, si verifica, infatti nel BAT un aumento della concentrazione dell'UCP1; è stato suggerito che tale proteina forma un canale (normalmente inibito dalla guanosina difosfato GDP [Nicholls DG, 1979]) capace di aumentare il passaggio passivo di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna dissipando, sotto forma di calore, il gradiente protonico determinato dall'ossidazione dei substrati energetici nella catena respiratoria, offrendo così una via di rientro alternativa per i protoni rispetto a quella rappresentata dall'ATP sintetasi [Klaus S et al, 1991; Cannon B e Nedergaard J, 1985]: in tal modo l'energia accumulatasi nel gradiente elettrochimico protonico non viene conservata come energia chimica sottoforma di ATP ma si rende disponibile come energia termica. E' stato proposto che questo meccanismo sia attivato anche nella termogenesi indotta dalla dieta. Si è poi visto che, a differenza di quanto accade nei ratti esposti al freddo, l'aumentata capacità termogenica del BAT, riscontrata nei ratti iperfagici non è dovuta ad una maggiore sintesi della proteina UCP1 [Desantels M e Himms-Hagen J, 1979; Himms-Hagen J et al, 1981], ma ad uno smascheramento dei siti di conduttanza protonica già esistenti sui mitocondri del tessuto [Ashwell M et al, 1984].



Dal momento dell'isolamento dell'UCP1 sono stati condotti molti studi i cui risultati hanno dimostrato che la trascrizione del gene dell'UCP1 è stimolata dall'AMP ciclico e la proteina risultante è attivata dagli acidi grassi [Ricquier D et al, 1991]. L'UCP1 lega anche i nucleotidi purinici (in particolare GDP), che sembrano inibire la sua funzione di traslocatore di protoni. Gli acidi grassi attivano l'UCP1 spostando il legame con i nucleotidi purinici e permettendo il passaggio dei protoni. In questo modo il gradiente protonico non è più utilizzato per formare ATP, ma per produrre calore.

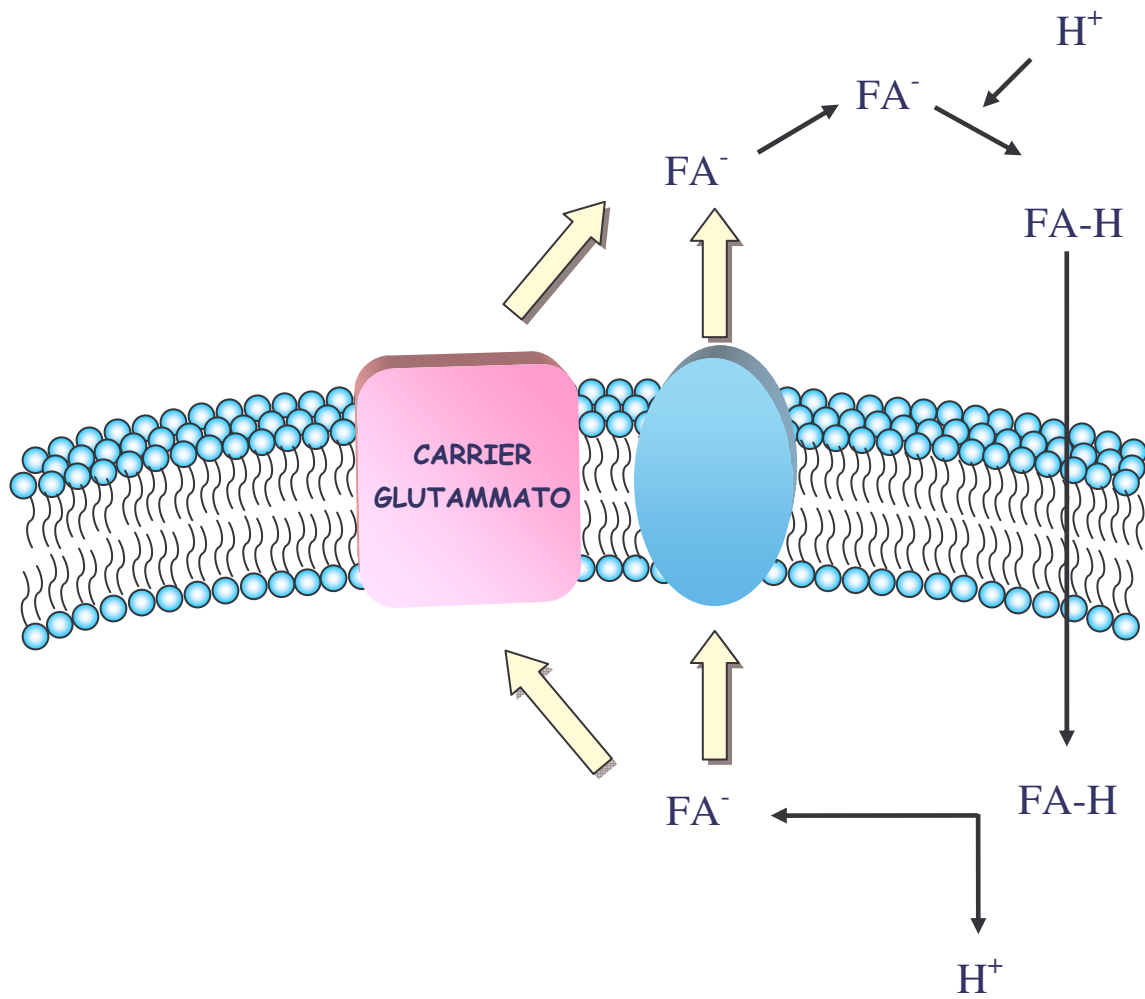
Tuttavia il meccanismo d'azione dell'UCP1 come catalizzatore del trasporto dei protoni non è ancora completamente conosciuto.

Sono stati postulati due modelli per spiegare il meccanismo molecolare dell'UCP1 [Klingenberg M e Winkler E, 1994; Garlid KD et al, 1996]:

- l'UCP1 agirebbe come trasportatore protonico e gli acidi grassi sarebbero degli attivatori allosterici del trasporto protonico stesso [Klingenberg M e Winkler E, 1994].
- l'UCP1 agirebbe da trasportatore degli acidi grassi in forma anionica, un processo chiamato ciclo degli acidi grassi (*figura 6*).

**Figura 6**

**Conduttanza protonica mitocondriale indotta dagli acidi grassi**



In effetti, secondo questa teoria gli anioni degli acidi grassi (che essendo carichi, non riescono a permeare la membrana mitocondriale interna) sono trasportati fuori dalla matrice dall'UCP1 o da altri trasportatori mitocondriali come l'ANT o il trasportatore glutammato/aspartato e dicarbossilato. Gli acidi grassi nello spazio intermembrana legano i protoni e rientrano nella matrice attraverso il doppio strato fosfolipidico della membrana. Gli acidi grassi a livello della superficie interna della membrana mitocondriale interna per effetto della differenza di pH vengono deprotonati (in questo modo si ha il passaggio di protoni dallo spazio intermembrana alla matrice e quindi il disaccoppiamento), l'acido grasso anionico formatosi viene traslocato di nuovo verso lo spazio intermembrana tramite l'UCP1 o gli altri sistemi proteici, ed il ciclo ricomincia [Garlid KD et al, 1996].

In entrambi i modelli, il risultato finale è una diminuzione del gradiente protonico attraverso la membrana mitocondriale interna.

La recente scoperta di proteine disaccoppianti, omologhe all'UCP1 e presenti in altri tessuti oltre che nel BAT, ha dato inizio a numerose ricerche atte ad identificare se esse possano essere responsabili di un incremento della conduttanza protonica basale e/o inducibile nei vari tessuti.

Nel 1997 una nuova UCP altamente omologa (59%) all'UCP1, e chiamata UCP2 [Fleury C et al, 1997; Boss O et al, 1997], fu identificata anche nell'uomo. La sua espressione è ubiquitaria, infatti, l'mRNA dell'UCP2 è presente in molti tessuti quali il BAT, il tessuto adiposo bianco (WAT), il muscolo, il cervello, il cuore, l'intestino, il rene, il timo, la milza, le cellule  $\beta$  del pancreas, ma non è presente negli epatociti, inoltre è presente in molti tipi cellulari come adipociti, miociti, linfociti, macrofagi [Fleury C et al, 1997; Gimeno RE et al, 1997]. Il gene dell'UCP2 è localizzato sul cromosoma 7 del topo, e sul cromosoma 11 dell'uomo, accanto alla regione associata al diabete e all'obesità [Solanes G et al, 1997].

Successivamente è stata scoperta l'UCP3 [Boss O et al, 1997; Vidal-Puig et al, 1997], una proteina omologa sia dell'UCP1 sia dell'UCP2 [Boss O et al, 1997; Vidal-Puig et al, 1997], in quanto la sua sequenza aminoacidica è identica per il 52% all'UCP1 e per il 73% all'UCP2. Tale proteina è presente nel muscolo scheletrico umano e dei ratti, e in questi ultimi è presente anche nel BAT, nel tessuto adiposo bianco e nel cuore; la sua espressione è regolata dall'introito calorico, dagli ormoni tiroidei e dall'esposizione al freddo [Gong DW et al, 1997; Larkin S et al, 1997].

Nel cervello è stata inoltre identificata un'altra proteina disaccoppiante l'UCP4 [Nicholls DG e Locke RM, 1984; Mao W et al, 1999].

Ipotizzando che all'analogia strutturale tra le diverse UCP possa corrispondere un'analogia funzionale e tenendo in considerazione le conoscenze raggiunte fino ad oggi circa la modalità d'azione dell'UCP1 nel BAT, si ritiene che l'UCP2 e l'UCP3 possano svolgere un ruolo di primaria importanza nella spesa energetica e nel controllo della conduttanza protonica indotta mitocondriale negli organi e tessuti in cui tali proteine sono espresse.

Gli studi in favore di un'attività disaccoppiante di queste proteine sono quelli che hanno mostrato che i topi che sovraesprimono UCP3 sono iperfagici e magri e mostrano una diminuita efficienza mitocondriale, mentre i topi mancanti d'UCP3 mostrano una ridotta conduttanza protonica mitocondriale [Gong DW et al, 2000; Vidal-Puig A et al, 2000].

Comunque l'attività biochimica e il ruolo biologico di queste UCP non sono ancora completamente chiarite.

### **I mitocondri sono una permanente fonte delle specie reattive dell'ossigeno**

I mitocondri sono da una parte i maggiori produttori di radicali liberi e dall'altra sono il principale bersaglio dei loro effetti dannosi. I radicali liberi si formano nelle cellule sia in seguito alle loro reazioni metaboliche sia in seguito a stimoli esterni (radiazioni ionizzanti, elevata tensione di ossigeno, sostanze chimiche, farmaci, stress di vario genere).

In special modo le *specie reattive dell'ossigeno (ROS)* sono specie chimiche con un singolo elettrone spaiato in un orbitale esterno; l'energia creata da questa configurazione instabile viene liberata durante la reazione con molecole vicine organiche ed inorganiche, come gli acidi nucleici, le proteine e i lipidi e, queste molecole sono convertite a loro volta in radicali liberi determinando un danno cumulativo. Tale configurazione dei ROS è conseguente ad una riduzione parziale della molecola di ossigeno, la quale necessita di quattro elettroni per potersi ridurre ad acqua. Dalla riduzione dell' $O_2$  da parte di un singolo elettrone si produce il radicale superossido  $O_2^{\bullet -}$ ; mentre dalla riduzione da parte di 2 elettroni si forma perossido di idrogeno  $H_2O_2$ .

La maggiore sorgente del radicale ione superossido cellulare ( $O_2^{\bullet -}$ ), che produce  $H_2O_2$  tramite la reazione di dismutazione e le specie idrossiliche ( $\bullet OH$ ) altamente reattive tramite la reazione di Fenton, è la catena respiratoria, localizzata nella membrana interna dei mitocondri [Maklashina E et al, 2004]. Le osservazioni che, nei mitocondri isolati, gli elettroni possano fuoriuscire dalla catena respiratoria sotto forma di radicali superossidi ( $O_2^{\bullet -}$ ) ha portato all'assunzione che la formazione di  $O_2^{\bullet -}$  è obbligatorio come sottoprodotto della respirazione [Staniek K e Nohl H, 2000]. Durante il passaggio degli elettroni dal complesso I e II fino alla citocromo ossidasi, si ha una maggiore produzione di ROS quando la

velocità di trasporto degli elettroni diminuisce. La formazione dei ROS è tanto maggiore, sia nello Stato 4 che nello Stato 3 della respirazione, quanto più è imponente la limitazione imposta al flusso di elettroni da parte del  $\Delta\mu\text{H}^+$  [Maklashina E et al, 2004]. Nonostante tutto, il principale sito di produzione del superossido è l'ubichinone [Wallace DC, 1992; Quant PA et al, 1991] e la sua forma ridotta, l'ubichinolo, mostra proprietà antiossidanti. E' stato suggerito che l'ubisemichinone ( $\text{SQ}^{\bullet-}$ ), formatosi sul lato citosolico del complesso III si sposta verso potenziali redox negativi. Questo cambiamento stabilisce le condizioni termodinamiche che permettono ad un elettrone di fluire verso un possibile  $\text{O}_2$  [Staniek K e Nohl H, 2000].

### **Danni causati dai radicali liberi a livello mitocondriale**

Le specie reattive dell'ossigeno sono studiate a fondo per essere la causa della patogenesi di varie malattie. Quasi dal 3 al 10% dell'ossigeno utilizzato dai tessuti è convertito nel suo intermedio reattivo, il quale danneggia il funzionamento delle cellule e dei tessuti [Noor R et al, 2002]. Superossidi,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , radicali idrossilici e radicali dell'ossigeno sono prodotti continuamente a velocità elevate come prodotti del metabolismo aerobico. Essi danneggiano le macromolecole cellulari, che includono DNA, proteine e lipidi generando altri radicali. L'accumulo di tali danni può contribuire all'invecchiamento e ad altre malattie degenerative. I deficit di energia

cellulare causati da declini nella funzione mitocondriale possono indebolire le normali attività cellulari e compromettere l'abilità delle cellule ad adattarsi a vari stress fisiologici.

#### *Danni ossidativi al DNA mitocondriale*

I livelli del danno ossidativo al DNA mitocondriale isolato dal fegato di ratto o da varie regioni del cervello umano sono maggiori rispetto a quelli del DNA nucleare [Richter C et al, 1998; Mecocci P et al, 1993]. Questi livelli superiori di danno ossidativo e mutazioni nel DNA mitocondriale sono attribuiti alla localizzazione del DNA vicino ai siti della membrana mitocondriale interna in cui si formano gli ossidanti. Inoltre il DNA mitocondriale non presenta un tipo di impacchettamento simile al DNA nucleare con proteine istoniche, che svolgono anche un ruolo protettivo nei confronti del DNA da parte di agenti esterni capaci di danneggiarlo. Le mutazioni che avvengono nel DNA mitocondriale si accumulano perché qui non esistono dei sistemi di riparazione del DNA.

Il DNA mitocondriale codifica per un numero limitato di polipeptidi della membrana mitocondriale interna, per tRNA e rRNA coinvolti nella sintesi di proteine mitocondriali [Ames BN et al, 1995]. Inoltre, presenta poche sequenze non codificanti, perciò ogni mutazione provoca degli effetti evidenti nella funzione mitocondriale [Hansford RG, 1983]. E' stata evidenziata anche una diminuzione dei livelli di mRNA. Probabilmente



l'accumulo di mutazioni e delezioni del DNA mitocondriale in seguito all'attacco da radicali, porta ad un abbassamento dei livelli trascrizionali, con conseguente alterazione nella sintesi dei complessi respiratori e nella sintesi dell'ATP.

### *Danni ossidativi alle proteine mitocondriali*

In una condizione di stress anche il numero di proteine mitocondriali danneggiate da radicali aumenta. L'accumulo di proteine con gruppi carbonilici ossidate, porta a delle reazioni inter/intra-molecole con gruppi amminici di altre proteine, con la conseguente perdita della loro funzionalità fisiologica e biochimica [Ames BN et al, 1995]. Così ciò potrebbe portare anche alla perdita della produzione di energia ed all'aumento della produzione di ossidanti.

*L'aconitasi*, un enzima del ciclo di Krebs, è un esempio di proteina danneggiata dai radicali liberi. Essa contiene nel suo sito attivo un "cluster" [4Fe-4S] che è il principale bersaglio dei superossidi.

È stato proposto che il "cluster" [4Fe-4S]<sup>2+</sup>, è ossidato dallo ione superossido, formando il "cluster" inattivo [3Fe-4S]<sup>1+</sup> a causa del rilascio reversibile del ferro [Vasquez-Vivar J et al, 2000]. In questa reazione i probabili prodotti sono ferro (II) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, perciò, l'inattivazione dell'aconitasi mitocondriale, mediata dal superossido, potrebbe incrementare la formazione del radicale idrossilico (•OH) attraverso la

reazione di Fenton nei mitocondri [Vasquez-Vivar J et al, 2000]. Questa selettiva e reversibile distruzione dei “cluster” [4Fe-4S], può essere usata per stimare la concentrazione dei superossidi nelle cellule di mammifero. [Longo VD et al, 2000].

#### *Danni ossidativi ai lipidi della membrana mitocondriale*

Le membrane svolgono un ruolo centrale nella bioenergetica delle cellule. Infatti, i mitocondri presentano una membrana con caratteristiche di permeabilità altamente selettiva: tale possibilità di selezione fa in modo che le vie del metabolismo avvengano in compartimenti separati. Inoltre la membrana mitocondriale fornisce anche il sostegno per il sistema di traduzione dell'energia [Hansford RG, 1983]. Cambiamenti nella permeabilità di membrana sono dovuti ad un incremento della perossidazione lipidica [Ames BN et al, 1995], che porta ad una diminuzione della fluidità di membrana rendendole più rigide. Nelle frazioni della membrana microsomale e mitocondriale di fegato isolate da roditori sembra esserci un declino progressivo nella quantità di acido linoleico [Laganieri S e Yu BP, 1993]. Questo cambiamento è accompagnato ad un incremento nella quantità di acidi grassi polinsaturi a lunga catena che mostrano un superiore grado di insaturazione e sono più sensibili alle reazioni di ossidazione rispetto all'acido linoleico. Infatti, l'aumento di fosfolipidi con un maggior grado di insaturazione rende le

membrane più suscettibili alla perossidazione.

La fosfolipasi A<sub>2</sub> sembra essere importante per il riparo dei lipidi danneggiati ossidativamente. L'attività della fosfolipasi A<sub>2</sub> nella membrana mitocondriale interna incrementa in risposta all'aumento della produzione di ossidanti [Hatch GM et al, 1993]. E' stato suggerito che la fosfolipasi A<sub>2</sub> sia un enzima di riparazione che catalizza la rimozione di lipidi ossidati dalle membrane. Senza tale attività riparatoria i lipidi perossidati potrebbero accumularsi, provocando un aumento della permeabilità della membrana nonché una perdita del controllo respiratorio mitocondriale.

### **Sistemi di difesa dai radicali liberi**

Per evitare l'intossicazione da  $O_2^{\bullet -}$  e dei prodotti della sua conversione in ROS, il mitocondrio è fornito di un sistema di difesa che previene la formazione dei ROS e rimuove quelli formati [Skulachev VP, 1997; Skulachev VP, 1998 (a)]. Due meccanismi di difesa particolarmente importanti sono quelli della *superossido dismutasi* e del *leggero disaccoppiamento*.

1. La *superossido dismutasi* (SOD), localizzata nella matrice mitocondriale, converte, tramite la reazione di dismutazione, il radicale  $O_2^{\bullet -}$  in  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Il perossido d'idrogeno può uscire dal mitocondrio perché è molto più permeabile del radicale  $O_2^{\bullet -}$ . L'importanza della SOD è evidenziata dal fatto che una mutazione del gene che codifica

per la SOD, provocando una sua inattivazione, conduce in molti casi allo sviluppo di malattie umane come il morbo di Parkinson , il morbo di Alzheimer, il cancro, la sindrome di Down, la cataratta e una serie di disordini neurologici [Noor R et al, 2002].

2. Il *leggero disaccoppiamento* può contrastare la formazione dei radicali liberi. Il leggero disaccoppiamento da parte degli acidi grassi liberi, mediato dai trasportatori anionici mitocondriali come l'antiporto ATP/ADP (ANT), l'antiporto aspartato/glutammato, proteine disaccoppianti, etc., mantiene il potenziale protonico mitocondriale sotto al livello soglia richiesto per stimolare la produzione di  $O_2^{\bullet -}$  da parte del complesso I e III [Skulachev VP, 1998 a].

Altri meccanismi con i quali l'organismo cerca di difendersi da una eccessiva produzione di radicali liberi sono:

- un'elevata attività della *citocromo ossidasi*, la quale, operando ad alta velocità anche a basse concentrazioni di ossigeno, può far effettivamente diminuire la concentrazione di ossigeno. In questo modo la concentrazione di ossigeno viene mantenuta ad un livello basso, tale da non essere sufficiente per un elevata velocità di formazione di  $O_2^{\bullet -}$  da parte degli enzimi della catena respiratoria [Skulachev VP, 1997; Skulachev VP, 1998 (a); Skulachev VP, 2001];

- il *citocromo c*, che catalizza l'ossidazione del  $O_2^{\bullet -}$  di nuovo ad ossigeno se il citocromo è desorbito dalla faccia esterna della membrana mitocondriale interna nello spazio intermembrana [Skulachev VP, 1998 (a)];
- la *glutathione perossidasi* e la *catalasi* mitocandriale che decompongono l'  $H_2O_2$  nella matrice;
- *Tocoferol*, *CoQH<sub>2</sub>*, *ascorbato* e altri antiossidanti di basso peso molecolare che direttamente eliminano i ROS [Skulachev VP, 1997].

Ovviamente tutti questi meccanismi non interferiscono con l'adempimento delle normali funzioni mitocondriali.

È da sottolineare che l'attivazione di questi meccanismi di difesa sono fondamentali per evitare l'insorgenza dei notevoli danni causati da un aumento di radicali liberi nella cellula.

### **Popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico: mitocondri subsarcolemmatici ed intermiofibrillari**

Differentemente, da altri organi o tessuti, in cui i mitocondri presenti hanno le stesse caratteristiche biochimiche e funzionali, costituendo un'unica popolazione mitocondriale, studi condotti sul muscolo cardiaco e scheletrico hanno dimostrato che in questi tessuti sono presenti due popolazioni mitocondriali, una localizzata direttamente sotto il sarcolemma

(mitocondri subsarcolemmatici, SS) ed un'altra tra le miofibrille (mitocondri intermiofibrillari, IMF) [Zborowski J e Wojtczak L, 1963].

È possibile isolare separatamente le due frazioni. Per esempio, i mitocondri SS sono stati isolati dal cuore con processore tissutale Polytron, mentre i mitocondri IMF sono stati ottenuti con una digestione con nagarse del restante tessuto [Wrigglesworth JM et al, 1993]. Questi risultati sono stati convalidati da osservazioni al microscopio elettronico che mostravano, in seguito al trattamento col Polytron, una rottura del sarcolemma con liberazione dei sottostanti mitocondri, ma con ritenzione dei mitocondri intatti tra le miofibrille. La microscopia elettronica dei mitocondri isolati ha mostrato che entrambi i tipi di mitocondri mantengono la loro integrità strutturale durante la procedura di isolamento [Wrigglesworth JM et al, 1993]. L'isolamento delle due popolazioni di mitocondri ha permesso una loro analisi separata. Tale studio ha dimostrato che queste popolazioni di mitocondri non solo presentano una localizzazione diversa nella cellula, ma anche differenze biochimiche e funzionali. Infatti, i risultati hanno indicato una maggiore attività della membrana mitocondriale interna e degli enzimi della matrice negli IMF rispetto agli SS. Le attività specifiche della succinico deidrogenasi e della citrato sintasi sono più alte nei mitocondri IMF rispetto a quelli SS, mentre quelle della carnitin-palmitoiltransferasi e

dell' $\alpha$ -glicerolo fosfato deidrogenasi sono approssimativamente le stesse in entrambe le popolazioni.

La capacità ossidativa dei mitocondri IMF è più alta di quella dei mitocondri SS con tutti i substrati utilizzati sperimentalmente [Iossa et al, 2002; Wrigglesworth JM et al, 1993].

Studi sulle caratteristiche biochimiche dei mitocondri IMF e SS isolati dal muscolo scheletrico sono potenzialmente molto importanti ai fini della comprensione dei ruoli che queste due frazioni mitocondriali occupano all'interno della cellula. Il muscolo scheletrico rappresenta un buon modello per la sua capacità di alterare il suo contenuto in mitocondri in risposta all'attività contrattile. Alterazioni della richiesta energetica, come ad esempio quelle imposte dall'attività contrattile, giocano un ruolo importante nel determinare la distribuzione cellulare e il contenuto in mitocondri. Numerosi esperimenti indicano che l'aumento o la diminuzione dell'attività muscolare portano a differenti adattamenti dei mitocondri SS e IMF [Dedukhova VI et al, 1991]. Ulteriori lavori hanno dimostrato che in alcuni stati fisiologici e patologici, una delle due popolazioni di mitocondri muscolari può aumentare di numero [Schönfeld P, 1990; Freaque HC, 1995]. Questo fenomeno suggerisce la presenza di un meccanismo compensatorio dei livelli degli organelli in risposta a specifiche stimolazioni della cellula [Wrigglesworth JM et al, 1993].

In conclusione le specifiche differenze biochimiche tra mitocondri IMF e SS del muscolo scheletrico sembrano coincidere con differenze nella capacità respiratoria, misurata utilizzando inibitori sito-specifici della catena di trasporto degli elettroni. Le differenze biochimiche possono essere in parte attribuite a un differente andamento della sintesi proteica mitocondriale. Occorrono ulteriori studi per identificare le specifiche proteine coinvolte, così come per mettere in relazione tali differenze con i possibili ruoli funzionali che queste due frazioni mitocondriali potrebbero giocare nel metabolismo energetico della cellula [Dedukhova VI et al, 1991].



# **SCOPO DELLA TESI**

L'attività di ricerca che ho condotto nel corso dei tre anni di dottorato, è stata incentrata sullo studio delle risposte adattative a stimoli fisiologici in cui è diminuita la spesa energetica, come il digiuno, la restrizione calorica, e la rialimentazione dopo un periodo di restrizione calorica.

Ho in particolare rivolto la mia attenzione alla valutazione di come gli effetti di questi stimoli si possono ripercuotere sulle caratteristiche strutturali e funzionali delle due popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico, uno dei tessuti di maggior rilievo dal punto di vista metabolico, allo scopo di conoscere il ruolo svolto da tale organo nella regolazione della spesa energetica.

La spesa energetica corporea è strettamente dipendente dallo stato nutrizionale dell'organismo. Infatti, un periodo di limitato o nullo apporto di nutrienti provoca una diminuzione adattativa nella spesa energetica dell'intero organismo, che è in parte attribuita ad un aumento dell'efficienza metabolica [Ramsey JJ et al, 2000]. Questo adattamento permette all'organismo un risparmio energetico, in quanto riduce la velocità alla quale le riserve lipidiche vengono consumate.

Tale riduzione della spesa energetica è di particolare importanza perché fa parte di un meccanismo regolatorio, che per bilanciare un deficit di energia, aumenta l'efficienza metabolica sopprimendo la termogenesi. In questo modo si riduce la velocità con cui è utilizzata l'energia corporea,

consentendo così una sopravvivenza più lunga. Inoltre, è stato mostrato che la diminuzione della spesa energetica persiste nel periodo di rialimentazione, immediatamente successivo ad un periodo di restrizione calorica [Dulloo AG e Girardier L, 1990], permettendo così un rapido ripristino delle riserve di grasso corporeo allorquando il cibo ritorna disponibile.

E' interessante notare che variazioni della spesa energetica dell'intero organismo riflettono paralleli cambiamenti soprattutto a livello di quegli organi e tessuti, che maggiormente contribuiscono alla spesa energetica corporea. Tra i tessuti che meritano la maggiore attenzione vi è sicuramente il muscolo scheletrico, che è il tessuto più abbondante del corpo e il suo metabolismo contribuisce per circa il 30% alla spesa energetica a riposo nel ratto [Dulloo AG e Jacquet J, 1998]. A tal proposito, l'analisi del flusso sanguigno con la tecnica delle microsfele accoppiato a misure del consumo di ossigeno artero-venoso ha mostrato che il muscolo scheletrico è un importante sito di risparmio energetico nei ratti a digiuno [Ma SWY e Foster DO, 1986]. Analogamente, nel caso della restrizione calorica e della successiva rialimentazione, l'ipotesi più accreditata identifica il muscolo scheletrico quale principale sito di riduzione della termogenesi in tale condizioni [Dulloo AG et al, 1995].

A livello cellulare importanti siti di termogenesi sono i mitocondri, dove la produzione e quindi l'utilizzazione dell'energia metabolica cellulare è essenzialmente regolata dall'attività e dall'efficienza della fosforilazione ossidativa, che è principalmente determinata dal grado di accoppiamento tra l'ossidazione mitocondriale dei substrati energetici e la produzione di ATP. Mitocondri con un alto grado di accoppiamento sono caratterizzati da un'elevata efficienza. Pertanto, sebbene la principale funzione dei mitocondri è la sintesi di ATP, c'è una notevole differenza nel grado con cui i mitocondri producono ATP da una determinata quantità di substrati energetici, che derivano dai nutrienti della dieta. Infatti, il grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale è sempre inferiore a uno, e questo valore può variare a seconda dei bisogni metabolici della cellula [Stucki JW, 1980]. E' stato dimostrato che mitocondri provenienti da differenti organi e tessuti presentano un grado di accoppiamento e quindi di efficienza variabile [Cairns CB et al,1998].

Tra i fattori che influenzano l'efficienza mitocondriale, un importante ruolo è attribuito alla permeabilità della membrana mitocondriale interna ai protoni. Infatti, quando vi è un'elevata permeabilità della membrana mitocondriale interna ai protoni, questi possono attraversare la membrana mitocondriale interna verso la matrice, impedendo così la sintesi di ATP e promuovendo la dispersione dell'energia sotto forma di calore. Questo

fenomeno costituisce il cosiddetto “*disaccoppiamento*” associato con un’efficienza mitocondriale diminuita. E’ abbastanza ben chiaro che i protoni possono rientrare nella matrice mitocondriale attraverso una via di conduttanza non specifica, denominata *conduttanza protonica basale*. Tale via è localizzata a livello della membrana mitocondriale interna di tutti i mitocondri, non è soggetta ad una regolazione acuta ed è stato calcolato che contribuisce (circa 20%) alla spesa energetica a riposo dei mammiferi [Rolfe DFS e Brand MD, 1996]. Tuttavia, nonostante molti studi siano stati eseguiti, la base molecolare della conduttanza protonica basale non è ancora ben conosciuta. E’, invece, ben noto che gli acidi grassi possono agire come disaccoppianti naturali della fosforilazione ossidativa, generando una via di *conduttanza protonica indotta* che è correlata alla concentrazione di acidi grassi liberi all’interno della cellula che, nella forma protonata, diffondono nei mitocondri, per poi fuoriuscire come anioni attraverso alcuni trasportatori mitocondriali presenti nella membrana interna, come il trasportatore dei nucleotidi adeninici (ANT), il carrier del glutammato e le cosiddette proteine disaccoppianti: UCP2 ed UCP3 [Schulacev VP, 1991; Jezek P et al, 1998]. La conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi, essendo correlata con la concentrazione intracellulare degli acidi grassi, che a sua volta, è associata alla loro

concentrazione plasmatica, è in relazione alle condizioni metaboliche dell'organismo.

Vi sono, quindi, due tipi di conduttanza protonica, che contribuiscono all'efficienza del compartimento mitocondriale. La combinazione della conduttanza protonica basale e del disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi potrebbe quindi contribuire all'efficienza del sistema mitocondriale. L'incompleto accoppiamento tra l'ossidazione del substrato e la produzione di ATP fa sì che i mitocondri siano il sito primario cellulare di produzione di calore. Un aumento del disaccoppiamento induce un incremento della produzione di calore, con conseguente dispersione di energia e maggiore utilizzo di substrati energetici. La situazione inversa induce un risparmio di substrati energetici con conseguente calo della termogenesi.

Sulla base dell'ipotesi che il muscolo scheletrico sia un importante sito effettore della ridotta termogenesi che avviene in situazioni di diminuita spesa energetica, ho ritenuto interessante studiare come variazioni delle caratteristiche energetiche e strutturali dei mitocondri del muscolo scheletrico potessero contribuire alla ridotta termogenesi. E' importante tenere presente che le cellule muscolari sono caratterizzate dalla presenza di due distinte popolazioni mitocondriali, una localizzata al di sotto del sarcolemma, da cui il nome di *mitocondri subsarcolemmatici (SS)* e l'altra

associata alle miofibrille, da cui il nome di *mitocondri intermiofibrillari* (IMF). E' noto in letteratura che queste due popolazioni mitocondriali presentano caratteristiche biochimiche e funzionali differenti [Iossa S et al, 2001; Bizeau ME et al, 1998; Cogswell AM et al, 1993; Krieger DA et al, 1980; Yajid F et al, 1998]. Tali differenze tra i mitocondri IMF e SS suggeriscono che queste due popolazioni possano giocare un differente ruolo metabolico nell'economia della cellula. Partendo da tali premesse, appare quindi evidente che la determinazione sia dell'efficienza metabolica delle due popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico, sia la determinazione della massa proteica mitocondriale consentirebbe di acquisire nuove conoscenze sul ruolo svolto da tale tessuto nella regolazione della spesa energetica e potrebbe fornire il meccanismo molecolare alla base del rapido ripristino delle riserve di grasso corporeo allorquando il cibo ritorna disponibile, dopo un periodo di restrizione calorica.

Alla luce di tali considerazioni, ho determinato la massa proteica mitocondriale, la conduttanza protonica basale e quella mediata dagli acidi grassi, come pure i parametri dell'accoppiamento e dell'efficienza termodinamica nei mitocondri IMF e SS isolati dal muscolo scheletrico nei ratti sottoposti a digiuno per 24 ore, a restrizione calorica per due settimane e a successiva rialimentazione per una settimana.

Ho determinato inoltre la respirazione mitocondriale in presenza di substrati FAD e NAD dipendenti in modo tale da coinvolgere i differenti siti di ingresso degli equivalenti riducenti nella catena respiratoria mitocondriale.

E', inoltre, noto che l'entità della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) dipende dal grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa, e perciò dall'efficienza. Infatti, un leggero disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, mantenendo il potenziale protonico mitocondriale sotto il livello soglia richiesto per produrre i radicali dell'ossigeno, è funzionale nell'ostacolare l'eccesso di produzione dei ROS. Pertanto, per capire se i trattamenti di digiuno, restrizione calorica e rialimentazione agendo sull'efficienza mitocondriale comportassero, anche, variazioni della formazione di radicali liberi e quindi un aumento del danno ossidativo cellulare, ho determinato l'attività dell'aconitasi mitocondriale, un enzima del ciclo di Krebs sensibile all'esposizione ai radicali liberi, e della superossido dismutasi, uno dei sistemi utilizzati dal mitocondrio per metabolizzare i ROS. Ho inoltre misurato il contenuto della proteina disaccoppiante UCP3 nelle suddette popolazioni mitocondriali, dato che è stato ipotizzato un suo ruolo nel contrastare la produzione di radicali liberi nei mitocondri [Krauss S et al, 2005].



Per quanto riguarda gli esperimenti sulla restrizione calorica e successiva rialimentazione, ho effettuato anche misure di bilancio energetico e della composizione corporea, contemporaneamente ho condotto una caratterizzazione metabolica dei ratti a restrizione calorica e rialimentati misurando i livelli plasmatici di insulina, glucosio e acidi grassi non-esterificati (NEFA).

Tenendo presente il ruolo svolto dal muscolo scheletrico nella termogenesi dell'intero organismo, l'analisi dei cambiamenti nell'efficienza dei mitocondri SS e IMF può essere importante sia nella comprensione dei meccanismi, che sono alla base degli adattamenti energetici corporei, sia nei meccanismi coinvolti nella produzione dei radicali liberi a livello cellulare.

# **PARTE SPERIMENTALE**

## **Animali e disegno sperimentale 1: 24h di digiuno**

Nel primo disegno sperimentale sono stati utilizzati ratti maschi del peso medio di ~160 g appartenenti al ceppo Wistar (Charles River, Calco, Como, Italia).

I ratti sono stati stabulati individualmente ed è stato loro consentito libero accesso a cibo ed acqua.

Un giorno prima del sacrificio, i ratti sono stati divisi in due gruppi:

- il primo gruppo è stato sacrificato allo stato alimentato;
- l'altro, è stato sacrificato dopo 24 ore di digiuno.

Al momento del sacrificio, avvenuto per decapitazione, i ratti sono stati anestetizzati mediante un'iniezione intraperitoneale di cloralio idrato (40mg/100g di peso corporeo). Rapidamente è stato prelevato dalle zampe posteriori il muscolo scheletrico (quadricipite, gastrocnemio, soleo, tibiale anteriore), da cui si è proceduto all'isolamento dei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF).

## **Animali e disegno sperimentale 2: restrizione calorica**

Nel secondo disegno sperimentale sono stati utilizzati ratti maschi appartenenti al ceppo Sprague-Dawley (Charles River, Calco, Como, Italia), di cui:

- un gruppo del peso medio di circa 220 g è stato sottoposto a restrizione

calorica per due settimane (gruppo FR);

- un altro gruppo di controllo (gruppo WM), di circa 100 g di peso medio, è stato alimentato ad libitum durante tutto il periodo sperimentale e rappresenta il controllo avente lo stesso peso dei ratti del gruppo FR, alla fine del periodo di restrizione.

La restrizione calorica nei ratti FR è stata realizzata somministrando un pasto giornaliero pari al 50% del loro normale introito calorico, misurato in esperimenti paralleli condotti su ratti della stessa età alimentati ad libitum.

All'inizio del trattamento ed alla fine della restrizione alcuni ratti sono stati sacrificati per la determinazione del contenuto energetico e della composizione corporea. Le carcasse di questi ratti sono state autoclavate, pesate, sminuzzate e infine omogeneizzate (con una diluizione 1:2 p/v) con un Polytron (circa 15000 rpm per 5 minuti/100g di carcassa). Aliquote dell'omogenato così ottenuto sono state congelate e in seguito utilizzate per le misure del bilancio energetico e della composizione corporea.

I restanti animali sono stati sacrificati al termine della restrizione per realizzare le misure sui mitocondri SS ed IMF isolati dal muscolo scheletrico. In particolare, ai ratti cui è stata eseguita un'iniezione intraperitoneale di anestetico (cloralio idrato alla dose di 40mg/100g di peso corporeo), rapidamente è stato prelevato dalle zampe posteriori il muscolo scheletrico (quadricipite, gastrocnemio, soleo, tibiale anteriore),

### **Animali e disegno sperimentale 3: rialimentazione**

Analogamente al disegno sperimentale 2, sono stati utilizzati ratti maschi appartenenti al ceppo Sprague-Dawley (Charles River, Calco, Como, Italia), suddivisi nei gruppi FR e WM.

I ratti del gruppo FR sono stati sottoposti prima a due settimane di restrizione calorica, e poi sono stati rialimentati per una settimana (gruppo RF) fornendo la stessa quantità media di cibo introdotta dai ratti dello stesso peso (WM).

Alla fine della restrizione e al termine della rialimentazione alcuni ratti sono stati sacrificati per la determinazione del contenuto energetico e della composizione corporea.

I restanti animali sono stati sacrificati al termine della rialimentazione per realizzare le misure sui mitocondri SS ed IMF isolati dal muscolo scheletrico. Anche in questo disegno sperimentale, come per il precedente, è stata eseguita la stessa procedura sia per l'isolamento dei mitocondri che per la preparazione delle carcasse utilizzate per le misure del bilancio energetico e della composizione corporea.

In tutti e tre i disegni sperimentali, i ratti sono stati stabulati singolarmente ad una temperatura di  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , e sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale di 12 ore di luce e 12 ore di buio. Il trattamento, la stabulazione ed il sacrificio dei ratti sono stati condotti nel rispetto delle direttive del

Ministero della Sanità Italiano.

### **Bilancio energetico**

Durante il periodo di trattamento (restrizione calorica o rialimentazione) sono stati controllati sia il peso corporeo che la quantità di cibo introdotta, sottraendo anche quella quantità eventualmente caduta nella gabbia durante l'introduzione del pasto. E' stato quindi possibile calcolare l'introito calorico lordo, ottenuto considerando il valore energetico della dieta standard di laboratorio (15,88 KJ/g), misurato con una bomba calorimetrica (calorimetro adiabatico Parr). L'utilizzo di tale strumento ha consentito la determinazione del contenuto energetico anche delle feci, prodotte durante tutto il periodo di trattamento: l'energia metabolizzabile introdotta si può quindi calcolare sottraendo all'introito calorico lordo il contenuto energetico delle feci e sottraendo infine un 4% di energia che si assume essere perso con le urine.

Per effettuare le misure con la bomba calorimetrica, i campioni sono stati essiccati, ridotti in polvere e pressati al fine di ottenere pastiglie di peso non superiore ai 200 mg. Per la misura ogni pasticca è messa su un piattello di platino, in contatto con un filo di nichel agganciato a due uncini di platino, attraverso cui è fatta passare la corrente elettrica. Questo sistema è posto in un recipiente d'acciaio circondato da un volume noto di acqua

distillata, il tutto completamente separato dall'esterno da un'intercapedine di materiale isolante. Nel recipiente d'acciaio è compresso ossigeno alla pressione di 35 atm, per rendere possibile la combustione del campione. Il calore fornito dall'ossidazione dei substrati presenti nel campione fa innalzare la temperatura del un volume noto di acqua distillata, che circonda il recipiente d'acciaio. Ogni misura può essere suddivisa in tre fasi:

- una prima fase in cui viene dato alle varie parti del calorimetro il tempo di raggiungere l'equilibrio termico ( $T_i$ );
- una seconda fase in cui il campione è ossidato e nel sistema si ha una variazione di temperatura ( $T_f$ );
- una terza fase in cui il calorimetro raggiunge nuovamente l'equilibrio termico.

Attraverso il registratore della temperatura collegato al termometro immerso nell'acqua, viene misurato l'innalzamento termico ( $\Delta T$ ), come differenza tra la temperatura massima alla combustione ( $T_f$ ) e quella prima della combustione ( $T_i$ ). Effettuando delle misure ripetute con pastiglie di acido benzoico secco, di cui è noto il calore specifico di combustione (26,4 KJ/g), è inizialmente determinata la capacità termica dell'apparecchio, dopodiché, conoscendo il peso delle pastiglie di campione e il  $\Delta T$  prodotto dalla loro combustione, è calcolato il loro contenuto energetico, espresso

come KJ prodotti per grammo di campione secco.

Dalle aliquote dell'omogenato di ratto che erano state preparate al momento del sacrificio dopo essiccamento in stufa a 60°C per 48 ore, è stato possibile determinare il contenuto energetico della carcassa, sempre mediante l'utilizzo della bomba calorimetrica.

A questo punto è stato possibile calcolare il guadagno energetico corporeo come differenza tra il contenuto energetico dei ratti alla fine del trattamento e quello calcolato sul gruppo di ratti sacrificati all'inizio del periodo sperimentale; la spesa energetica, in base all'equazione del bilancio energetico, è stata calcolata come differenza tra l'energia introdotta e quella guadagnata. L'efficienza metabolica lorda è stata ottenuta dal rapporto percentuale tra il guadagno energetico e l'energia metabolizzabile assunta.

### **Misura della composizione corporea**

Dall'omogenato di carcassa vengono prelevate delle aliquote per la determinazione del contenuto di acqua, lipidi e proteine. Il contenuto di acqua è ottenuto per differenza tra il peso delle aliquote di omogenato prima e dopo dell'essiccamento in stufa a 60°C per 48 ore. Il contenuto lipidico è invece calcolato mediante il metodo di Folch [Folch et al, 1957], che consiste in una estrazione iniziale dei lipidi dall'omogenato di carcassa, diluito 20 volte in una miscela cloroformio/metanolo (2:1), seguita da



filtrazione; al filtrato ottenuto vengono aggiunti 0,2 volumi di NaCl 0,29% e dopo un'agitazione vigorosa di 30 minuti e una centrifugazione a 1000 g per 20 minuti (21°C), si osserva la separazione di una fase acquosa superiore ed una fase lipidica inferiore. A questo punto la fase acquosa viene aspirata con una pompa e l'interfaccia viene lavata con una soluzione contenente cloroformio/metanolo/NaCl (3:48:47), con lo scopo di eliminare i contaminanti non lipidici dall'estratto; nel passaggio successivo la fase lipidica viene versata in palloni di vetro di cui è noto il peso, per ottenere l'evaporazione dei solventi organici, mediante l'utilizzo dell'evaporatore rotante Heidolph. Si risale così al peso dei lipidi per grammo di carcassa e, attraverso il coefficiente 39,2 KJ/g è convertito il contenuto lipidico in KJ di energia corporea depositata sotto forma di lipidi.

Il contenuto proteico della carcassa è stato calcolato per differenza tra il contenuto energetico totale e quello dovuto ai lipidi.

Il guadagno lipidico (o quello proteico), espresso in KJ, viene quindi calcolato come differenza tra l'energia depositata sotto forma di lipidi (o proteine) che è stata misurata nei ratti alla fine del trattamento e quella determinata nei ratti all'inizio del periodo sperimentale.

Per calcolare il costo di deposito di lipidi e proteine, ovvero i KJ di energia spesi per il loro deposito, si moltiplicano i rispettivi guadagni per il coefficiente 0,36 KJ/KJ nel caso dei lipidi e 1,25 KJ/KJ per le proteine.

Infine, la spesa energetica netta, che esprime il costo di mantenimento delle funzioni vitali dell'organismo, si ottiene sottraendo alla spesa energetica il costo di deposito totale (la somma dei costi di deposito di lipidi e proteine).

## **Preparazione dei mitocondri subsarcolemmatici e**

### **intermiofibrillari dal muscolo scheletrico**

Il muscolo prelevato viene pesato, dopo aver eliminato l'eccesso di grasso e connettivo (*figura 7*). In seguito il muscolo viene sminuzzato in una soluzione contenente KCl 100 mM, Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM, 0,1% (p/v) di albumina serica libera da acidi grassi (BSA), a pH 7,5. I frammenti tissutali così ottenuti vengono omogenizzati con la stessa soluzione (1:8 p/v) in un omogenizzatore Potter Elvehjem (Heidolph, Kelheim, Germania) regolato a 500 rpm (4 colpi per un minuto). Un'aliquota di omogenato per ogni campione viene congelata immediatamente per la successiva determinazione dell'attività della citrato sintasi. L'omogenato restante è sottoposto a centrifugazione a 500 g per 10 minuti a 4°C: i mitocondri IMF insieme alle componenti più pesanti della cellula (nuclei, frammenti di membrana e cellule rimaste intatte) precipiteranno, mentre nel surnatante rimarranno sospesi i mitocondri SS. E', dunque, a questo punto che le preparazioni si separano:

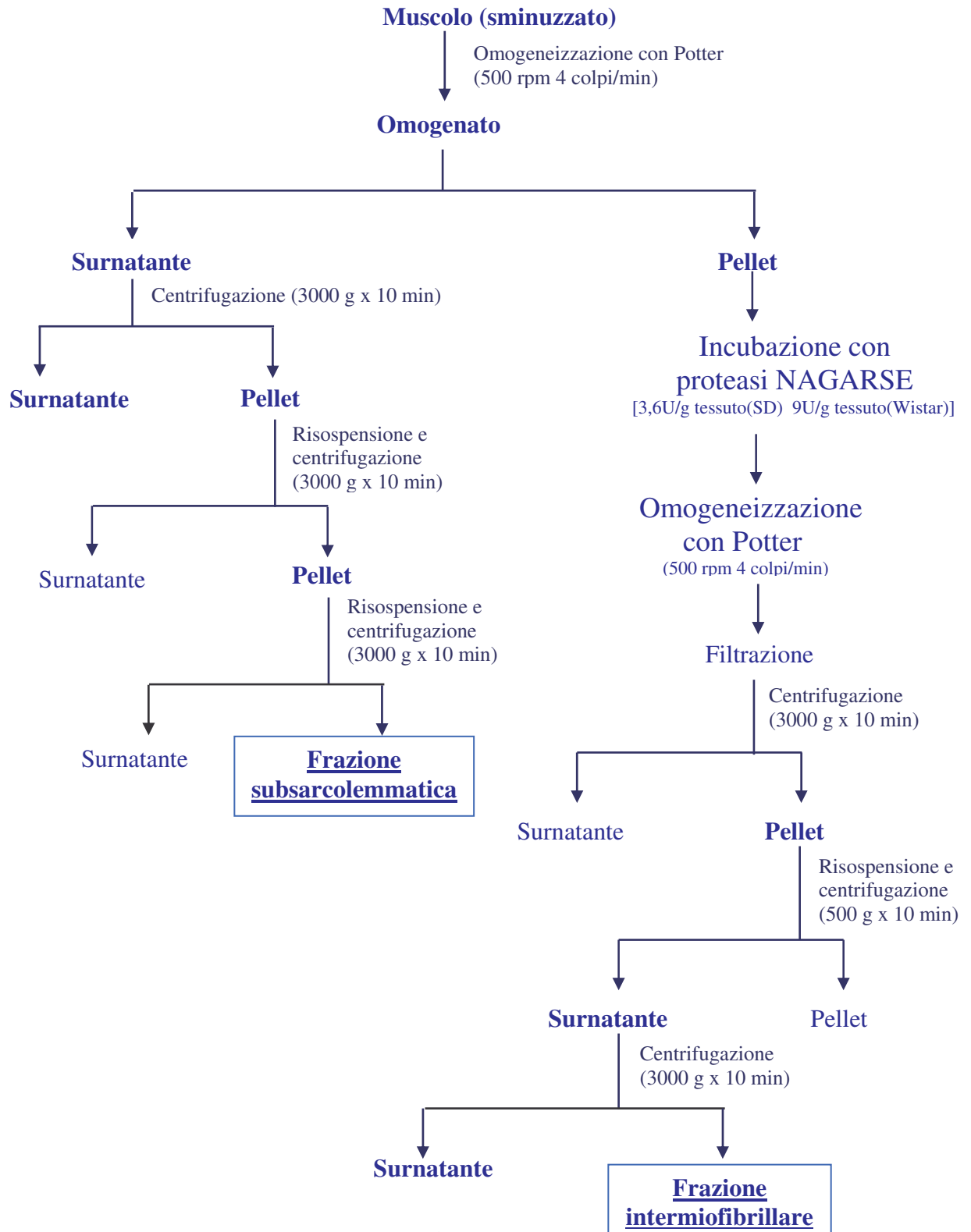
- per i mitocondri SS, dalla centrifugazione a 3000 g per 10 minuti a 4°C

del surnatante si ottiene un pellet, che poi viene sottoposto ad un lavaggio per due volte ed infine risospeso in un mezzo contenente saccarosio 250 mM, Tris 50 mM, 0,1% di BSA, a pH 7,5;

- per i mitocondri IMF, il pellet derivato dalla prima centrifugazione viene trattato con proteasi nagarse (9 U/g di tessuto per i ratti Wistar e 3,6 U/g di tessuto per i ratti Sprague-Dawley) per 5 minuti ad una temperatura di 4°C, la sospensione viene poi omogenizzata, filtrata attraverso una garza sterile e centrifugata a 3000 g per 10 minuti. Il pellet viene risospeso e centrifugato a 500 g per 10 minuti a 4°C, ed il surnatante risultante è ricentrifugato a 3000 g per 10 minuti. Il pellet ottenuto viene lavato una sola volta e risospeso in un mezzo contenente saccarosio 250 mM, Tris 50 mM, 0,1% di BSA, a pH 7,5.

**Figura 7**

**Procedura d'isolamento delle due frazioni mitocondriali di muscolo scheletrico**



## **Dosaggio Proteico**

Aliquote delle due frazioni mitocondriali, diluite 1:25, sono state sottoposte ad un dosaggio proteico, condotto secondo il metodo di Hartree, una modifica al metodo di Lowry, [Hartree EF, 1967], per determinare la concentrazione di proteine mitocondriali nei mitocondri isolati. Tale dosaggio è di tipo colorimetrico, quindi determina la formazione di un colore la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica nel campione.

Tale metodo combina la reazione del biureto con quella del Folin-Ciocalteu, ed il colore che si sviluppa proviene dalla riduzione degli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico a blu di tungsteno e di molibdeno, operata dal complesso Cu-proteina, dal triptofano e dalla tirosina delle proteine in ambiente alcalino. La modifica rispetto al metodo di Lowry sta in un aumento della concentrazione di tartrato di sodio-potassio e nell'impiego di temperature più elevate (50°C). Tali variazioni rendono la metodica più sensibile e consentono una correlazione lineare tra assorbanza e concentrazione proteica per un più ampio intervallo di valori di concentrazione. Lo standard utilizzato è la BSA.

## **Misura dell'attività respiratoria sui mitocondri isolati**

L'attività respiratoria nei mitocondri isolati è stata misurata con un metodo

polarografico, realizzato attraverso l'uso dell'elettrodo ad ossigeno di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA). Tale elettrodo è costituito da un catodo di platino e un anodo di argento, immersi in una soluzione di KCl (ponte salino) e separati dalla soluzione in esame tramite una membrana. L'ossigeno diffonde attraverso la membrana dalla soluzione presente nella camera di misura al compartimento dell'elettrodo. Quando si applica agli elettrodi un voltaggio di 0,5–0,8 volts, l'ossigeno al catodo viene ridotto da 4 elettroni prodotti all'anodo, originando così una corrente proporzionale alla sua quantità nella soluzione in esame. La tensione di ossigeno al catodo, quindi tende ad azzerarsi promuovendo la diffusione dell'ossigeno verso il catodo. Per questo l'elettrodo di Clark risulta utile nelle misure dei rapidi cambiamenti dell'utilizzazione dell'ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari. Le misure sono state realizzate in camere termostate ad una temperatura di 30°C utilizzando un mezzo di incubazione contenente KCl 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, 0,1% (p/v) di BSA, a pH 7,0.

Prima di procedere alla misura del consumo di ossigeno, i mitocondri sono indotti a consumare i substrati endogeni, mediante una preincubazione di qualche minuto, alla fine della quale sono aggiunti i substrati respiratori. I substrati respiratori utilizzati sono stati: a) il succinato (10 mM), come

substrato FAD dipendente e il rotenone ( $3,75 \mu\text{M}$ ), come inibitore del primo complesso della catena di trasporto della membrana mitocondriale interna, la NADH deidrogenasi, si misura in questo modo solo il passaggio di elettroni dal secondo al quarto complesso della catena di trasporto mitocondriale, elettroni ceduti alla catena di trasporto dal  $\text{FADH}_2$ ; 2) il glutammato ( $10 \text{ mM}$ ) come substrato NAD dipendente e malato ( $2,5 \text{ mM}$ ); 3) palmitoil-CoA ( $40 \mu\text{M}$ ) come substrato lipidico, e carnitina ( $2 \text{ mM}$ ) + malato ( $2.5 \text{ mM}$ ).

La velocità del consumo di ossigeno è stata misurata in presenza di quantità saturanti di ATP ( $0,67 \text{ mM}$ ), in tale condizione si misura lo *Stato 3* della respirazione, che rappresenta la massima velocità del consumo di ossigeno.

La velocità del consumo di ossigeno è stata misurata anche in assenza di ATP, determinando il cosiddetto *Stato 4* della respirazione.

Il rapporto di controllo respiratorio (*RCR*) è calcolato come rapporto tra Stato 3 e Stato 4, e rappresenta un indice dell'integrità dei mitocondri.

Il consumo di ossigeno è espresso in ngatomi al minuto per mg di proteine mitocondriali.

### **Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati**

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato misurato utilizzando la lettura spettrofotometrica, ottenuta mediante uno spettrofotometro (JASCO) a doppia lunghezza d'onda, della safranina, un colorante che in

virtù della sua carica elettrica si lega alla membrana mitocondriale in maniera proporzionale al potenziale [Nedergaard J, 1983]. Lo spettrofotometro adoperato è programmato in modo tale che la lunghezza d'onda di riferimento (533 nm) coincida con il punto isosbastico della safranina, cioè quel punto dello spettro di assorbimento in cui la molecola di colorante mostra la stessa assorbanza sia nello stato legato che in quello non legato alla membrana mitocondriale. La lunghezza d'onda di lettura è invece 511 nm. Per risalire al potenziale di membrana dai valori dell'assorbanza si effettuano misure dell'assorbanza della safranina in presenza di valinomicina 3 mM, un trasportatore specifico del potassio, e di quantità crescenti di KCl necessarie ad alterare la concentrazione esterna di potassio nel range 0,1-20 mM. A questo punto si costruisce una retta di taratura che mette in relazione le variazioni di assorbanza al logaritmo della concentrazione di potassio esterna, e che, quindi, consente di risalire alla concentrazione extra ed intramitocondriale di tale ione. Per estrapolazione da tale retta, infatti, si ricava la concentrazione interna di potassio, considerando che quando la variazione di assorbanza della safranina è nulla, anche il potenziale di membrana è pari a zero e quindi, in base all'equazione di Nernst, le concentrazioni di potassio esterna ed interna si equivalgono [Nedergaard J, 1983]. Ottenute le concentrazioni di potassio esterna ed interna alla membrana mitocondriale, mediante l'equazione di



Nernst ( $\Delta\Psi = 61 \text{ mV} \times \log ([K^+]_{\text{in}}/[K^+]_{\text{out}})$ ) si può calcolare il potenziale di membrana dei mitocondri e realizzare un grafico per mettere in relazione i valori di potenziale di membrana con l'assorbanza della safranina. Per interpolazione da tale curva si potranno ottenere i valori del potenziale di membrana mitocondriale nelle varie condizioni sperimentali utilizzate.

### **Misura della conduttanza protonica basale**

L'applicazione del metodo di Brand [Brand MD, 1990] ha consentito la valutazione della conduttanza protonica basale dei mitocondri isolati: tale metodica consiste in una titolazione della respirazione con il succinato a partire dallo Stato 4, in presenza di oligomicina, con quantità crescenti di malonato, un inibitore competitivo del secondo complesso della catena respiratoria, la succinico deidrogenasi, e permette di determinare le variazioni del potenziale di membrana associate alle variazioni del consumo di ossigeno ottenute in queste condizioni. Per poter determinare sperimentalmente la conduttanza protonica basale si adopera l'oligomicina, un antibiotico capace di abolire il flusso di protoni attraverso l'ATP sintetasi, prevenendo il passaggio dei protoni attraverso la subunità  $F_o$ . In questo modo si fa sì che il flusso protonico valutato dipenda solo dalla conduttanza protonica basale.

Per una determinazione accurata della conduttanza protonica basale, può essere valutata la risposta cinetica del potenziale di membrana mitocondriale a variazioni del consumo di ossigeno ottenute diminuendo progressivamente le reazioni di ossidazione del succinato del mitocondrio nello Stato 4 con un inibitore della catena di trasporto degli elettroni quale il malonato. Al diminuire della velocità di ossidazione del substrato diminuisce la velocità di pompaggio di protoni all'esterno e quindi anche il valore del potenziale di membrana. La variazione del consumo di ossigeno in funzione del potenziale di membrana, in un mitocondrio che respira in assenza di fosforilazione, ci permette di valutare la variazione cinetica della conduttanza protonica in funzione del potenziale di membrana. Infatti, le curve di titolazione così ottenute sono una misura indiretta della conduttanza protonica perché, in stato stazionario, la velocità del consumo di ossigeno (cioè il flusso protonico in uscita) nei mitocondri in assenza di fosforilazione equivale al flusso protonico in entrata dovuto alla conduttanza protonica. In effetti, il potenziale di membrana è uno dei due componenti della forza proton motrice ( $\Delta p$ ), l'altro è la differenza di potenziale chimico protonico ( $\Delta pH$ ).

Sperimentalmente è possibile abolire il  $\Delta pH$  facendo in modo che il  $\Delta p$  risulti uguale al  $\Delta \Psi$ : a questo scopo si utilizza la nigericina, uno scambiatore  $H^+/K^+$ , in grado di annullare la differenza di pH a livello della

membrana mitocondriale interna, e di conseguenza abolire la differenza di potenziale chimico, trasformandola in differenza di potenziale.

Le misure sono state effettuate a 30°C in una soluzione contenente LiCl 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, Tris-PO<sub>4</sub> 20 mM, succinato 10 mM, rotenone 3,75 µM, oligomicina 2 µg/ml, safranina O (83,3 nmol/mg) e nigericina (80 ng/ml) 0,1% (p/v) di BSA, a pH 7,0. La titolazione dello Stato 4 della respirazione è stata eseguita mediante sequenziali aggiunte di malonato fino a 5 mM.

### **Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi**

Per avere informazioni più precise sul disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi è stata anche effettuata la determinazione della cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi in analogia a quella effettuata per la conduttanza protonica basale. Tale determinazione è stata ottenuta titolando la respirazione ed il potenziale di membrana in presenza di oligomicina, succinato e palmitato con quantità crescenti di malonato fino a 0,6 mM per i mitocondri IMF e 1,07 mM per i SS.

Inoltre, il contributo dei vari sistemi proteici mitocondriali responsabili dell'effetto disaccoppiante del palmitato è stato determinato valutando la capacità di ligandi e/o inibitori specifici di tali proteine di abolire l'effetto disaccoppiante del palmitato. Infatti, il contributo dell'ANT, del carrier del glutammato e di altri sistemi è stato valutato misurando l'effetto

riaccoppiante della carbossiatractiloside (CAT, 10 nmol/mg proteine), del glutammato (7nM) e della BSA (0,4% p/v).

### **Misure del contenuto di ANT**

Il contenuto di ANT dei mitocondri SS e IMF è stato determinato mediante la titolazione dello Stato 3 della respirazione con concentrazioni crescenti di CAT in un mezzo contenente KCl 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, 0,1% (p/v) di BSA, a pH 7,0 e in presenza di succinato 10 mM e rotenone 3,75 µM.

I mitocondri sono stati preincubati con la CAT nel mezzo respiratorio per un minuto prima che l'ADP (0,67 mM) fosse aggiunta per iniziare lo Stato 3 della respirazione.

Il contenuto mitocondriale di ANT è stato determinato mediante estrapolazione della parte lineare della curva di titolazione per ottenere la quantità di CAT richiesta per inibire completamente la respirazione dello Stato 3.

### **Misura del coefficiente di accoppiamento termodinamico e dell'efficienza termodinamica**

Il controllo della respirazione mitocondriale e della fosforilazione ossidativa è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare.

Tale controllo è esercitato a due livelli:

- regolazione della velocità del consumo di ossigeno e della sintesi di ATP;
- regolazione dell'efficienza della fosforilazione ossidativa [Kadenbach B, 2003].

In effetti, l'energia prodotta dalla fosforilazione ossidativa sembra esercitare un forte controllo sulla velocità di ossidazione [Rottenberg H, 1979]. I mitocondri quindi non consumano ossigeno e producono ATP ad una velocità massima semplicemente limitati dalla disponibilità di substrati, ma possono variare l'efficienza della fosforilazione ossidativa aumentando la produzione di ATP, il potenziale cellulare fosfato o la spesa energetica per produrre ATP [Stucki JW, 1982].

Il coefficiente di accoppiamento termodinamico  $q$  rappresenta l'accoppiamento tra consumo di ossigeno e produzione di ATP nella fosforilazione ossidativa e si calcola con l'equazione formulata da Cairns [Cairns CB et al, 1998] :

$$q = \sqrt{1 - (J_{sh}/J_{unc})}$$

dove  $J_{sh}$  rappresenta il consumo di ossigeno nello stato stazionario e si ottiene sperimentalmente dalla misura della respirazione mitocondriale in un mezzo contenente KCl 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, 0,1% (p/v) di BSA, a pH 7,0 e in presenza di succinato 10 mM, rotenone 3,75 μM e oligomicina 2 μg/ml, mentre  $J_{unc}$

rappresenta la respirazione disaccoppiata (*uncoupled rate*) e si ottiene dalla misura della respirazione dello Stato 4 in presenza di succinato 10 mM, rotenone 3,75  $\mu\text{M}$ , dopo l'aggiunta di FCCP 1  $\mu\text{M}$ , un disaccoppiante sintetico che annulla il gradiente protonico e quindi anche la sintesi di ATP a livello della membrana mitocondriale. Il grado di accoppiamento termodinamico  $q$  è un parametro adimensionale, sempre minore di 1, e può inoltre assumere diversi valori a seconda dei bisogni energetici della cellula [Stucki JW, 1980].

L'efficienza termodinamica è invece calcolata con l'equazione formulata da Cairns [Cairns CB et al, 1998] :

$$\eta = q^2 / (1 + \sqrt{1 - q^2})^2$$

quindi il principale determinante dell'efficienza termodinamica è rappresentato dal grado di accoppiamento tra consumo di ossigeno e sintesi di ATP.

La condizione ottimale per la conversione dell'energia biologica non è necessariamente lo stato di massima efficienza termodinamica. Rottenberg [Rottenberg H, 1979] ha proposto che nei sistemi biologici l'efficienza per una massima energia in uscita dovrebbe essere minore del 50%. La velocità di produzione dell'energia o il mantenimento del potenziale cellulare fosfato potrebbero essere più importanti dell'efficienza nel processo di conversione dell'energia.

## **Misura del contenuto di UCP3 nei mitocondri isolati**

Aliquote di 40 µg delle proteine mitocondriali vengono denaturate in un buffer contenente Tris 60 mM a pH 6,8 e saccarosio 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanolo 4%, blu di bromofenolo 0,06% e caricate su di un gel di poliacrilammide-SDS al 12% con un marker proteico (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Dopo la corsa elettroforetica in un buffer contenente Tris 50 mM a pH 8,3 e glicina 384 mM, SDS 0,1%, le proteine vengono trasferite dal gel su una membrana di polivinilidene difluoride (PVDF) (Immobilon-P, Millipore, Switzerland) a 0,8 mA/cm<sup>2</sup> per 90 minuti. La membrana viene poi prebloccata in un buffer contenente PBS (soluzione tamponata con fosfato, NaCl 13,7 mM, KCl 0,3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 mM; latte 5%; 0,5% di Tween 20) per un'ora e poi incubata per una notte a 4°C con una soluzione di un anticorpo policlonale specifico per la proteina UCP3 (Chemicon International, CA, USA) diluito 1:3000 nello stesso buffer. Infine la membrana viene lavata tre volte per 15 minuti in una soluzione di PBS, 0,5% di Tween 20, e tre volte per 15 minuti in una soluzione di PBS; viene poi incubata per un'ora a temperatura ambiente con una soluzione di anticorpo secondario, diluito 1:10000, coniugato con una fosfatasi alcalina (Promega Corporation, WI, USA). La membrana viene lavata come appena descritto, risciacquata in acqua distillata ed incubata a temperatura ambiente in una soluzione

contenente CDP-Star (Sigma-Aldrich, MO, USA), un substrato chemiluminescente diluito 1:5. Le bande sono ottenute esponendo una pellicola autoradiografica (Kodak, Eastman Kodak Company, NY, USA) alla membrana; i dati, invece, sono acquisiti mediante un densitometro e quantificati con l'UN-SCAN-IT Software (Silk Scientific Corporation, Utan, USA).

### **Determinazione della massa proteica mitocondriale**

La misura della massa proteica mitocondriale si può ottenere seguendo due vie: 1) dalla misura dell'attività di un enzima marker mitocondriale, la citrato sintasi, determinata sia negli omogenati sia nei mitocondri isolati dal muscolo scheletrico, 2) dalla valutazione della resa mitocondriale.

Seguendo il primo approccio sperimentale, l'attività della citrato sintasi misurata nell'omogenato ed espressa per g di muscolo riflette il prodotto della massa proteica mitocondriale e dell'attività specifica dell'enzima citrato sintasi, ottenuta attraverso la misura dell'attività di tale enzima nei mitocondri SS ed IMF ed espressa per mg di proteine mitocondriali. Inoltre, per determinare la massa proteica mitocondriale in ciascuna popolazione mitocondriale, l'attività della citrato sintasi misurata nei mitocondri SS e IMF è espressa per g di tessuto iniziale. In esperimenti preliminari era stato valutato il grado di purezza dei mitocondri IMF ed SS, misurando la possibile contaminazione da parte di altre ATPasi contenute



nei residui di membrane. I risultati di tali esperimenti hanno mostrato un buon grado di purezza dei suddetti mitocondri.

Nel secondo metodo di stima della massa proteica mitocondriale è stata valutata la resa proteica mitocondriale andando ad esprimere in g di tessuto iniziale, i mg di proteina mitocondriale ottenuta dall'isolamento delle popolazioni mitocondriali SS e IMF. I cambiamenti nella resa mitocondriale possono dipendere da due condizioni: a) cambiamenti nella quantità dei mitocondri nel tessuto iniziale; b) cambiamenti nelle caratteristiche di sedimentazione degli organelli. Per escludere la possibilità che i cambiamenti nella resa mitocondriale possano essere dovuti alla perdita dei mitocondri durante la procedura d'isolamento, si stima la resa dell'attività della citrato sintasi nelle varie aliquote prelevate durante la procedura di isolamento dei mitocondri SS o IMF.

La citrato sintasi è stata determinata in accordo con Srere [Srere PA, 1969]. La misura si realizza incubando, alla temperatura di 30°C, i mitocondri o l'omogenato, diluiti 1:10 in Triton 0,5%, in un buffer costituito da DTNB (1 mM), Acetil-CoA (10 mM), Ossalacetato (10 mM). Inoltre la misura è realizzata in presenza del Triton 0,5%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare.

La determinazione dell'attività della citrato sintasi è stata effettuata spettrofotometricamente monitorando l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 412 nm ogni 30 secondi per tre minuti.

L'attività della citrato sintasi è calcolata usando il coefficiente di estinzione molare  $\varepsilon = 13600 \text{ M}^{-1}$ . Quindi, dalla media dei  $\Delta A \text{ min}^{-1}$  per ogni campione, si calcola la molarità del CoA formatosi al minuto, corrispondente all'attività della citrato sintasi, per i mg di proteine mitocondriali o i g di tessuto incubati.

### **Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale**

L'aconitasi, il secondo enzima del ciclo di Krebs, catalizza la interconversione reversibile di acido citrico in isocitrico, che viene poi ossidato dalla isocitrico deidrogenasi ad  $\alpha$ -chetoglutarato, con formazione di NADP ridotto. Poichè il NADPH assorbe a 340 nm, il dosaggio dell'aconitasi viene effettuato spettrofotometricamente, misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm dovuto proprio alla formazione di NADPH.

Il dosaggio dell'aconitasi è un metodo sensibile per misurare i danni “in vivo” prodotti dai radicali liberi sulla funzione delle macromolecole biologiche [Gardner PR, 2002]. Infatti l'aconitasi è particolarmente sensibile all'attacco e all'inattivazione da parte dei radicali ossigeno [Fridovich I, 1995; Flint DH e Allen RM, 1993; Gardner PR et al, 1997;

Drapier JC e Hibbs JBJ, 1996], per cui la sua attività è danneggiata dalla presenza di elevati livelli di radicali liberi.

Per il dosaggio si utilizzano solo campioni congelati in azoto liquido immediatamente dopo l'isolamento e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ , in quanto l'attività dell'aconitasi si danneggia in tempi molto brevi.

I campioni si incubano a  $25^{\circ}\text{C}$  in un buffer costituito da Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 e  $\text{MnCl}_2$  0,6 mM,  $\text{NADP}^+$  0,2 mM, sodio-citrato 30 mM e 2 U/ml di isocitrico deidrogenasi.

La misura è stata realizzata in presenza del Triton 1%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare.

La determinazione dell'attività dell'aconitasi è stata effettuata monitorando l'assorbanza a 340 nm ogni minuto per 50 minuti (SS) o 90 minuti (IMF).

L'attività dell'aconitasi è calcolata usando il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$  del NADPH,  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , e assumendo la conversione di una molecola di citrato in una molecola di NADPH mediante l'isocitrico deidrogenasi. Quindi, dalla media dei  $\Delta A_{\text{min}}^{-1}$  per ogni campione, si calcola la molarità del NADP ridotto formatosi al minuto, corrispondente all'attività dell'aconitasi.

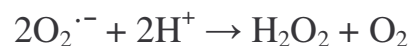
Assumendo inoltre che una milliunità di attività dell'aconitasi rappresenti la quantità che catalizza la conversione di 1 nmol di citrato in isocitrato al

minuto, si calcola l'attività dell'enzima espressa come mU/mg di proteine mitocondriali.

Il livello dell'attività dell'aconitasi misurata nell'estratto mitocondriale eguaglia l'aconitasi attiva (livello basale). L'aconitasi inibita dai ROS in vivo è stata riattivata affinché l'attività totale possa essere misurata mediante l'incubazione degli estratti mitocondriali in un mezzo contenente ditioneitrato 50 mM, Na<sub>2</sub>S 0,2 mM e solfato ammonio ferroso 0,2 mM.

### **Determinazione dell'attività della superossido dismutasi**

La superossido dismutasi è un enzima che catalizza la reazione:



Quindi ha il compito di ripulire la cellula dai radicali liberi e mantiene la concentrazione dei radicali ossigeno ad un livello straordinariamente basso in diverse cellule e organelli [Imley J A e Fridovich I, 1991].

Il dosaggio della superossido dismutasi si realizza spettrofotometricamente andando a monitorare la velocità di riduzione del citocromo C, utilizzando il sistema xantina-xantina ossidasi come produttore di O<sub>2</sub><sup>·-</sup>.

La superossido dismutasi, competendo con i radicali O<sub>2</sub><sup>·-</sup> che determinano la riduzione del citocromo C, provoca una diminuzione della velocità di riduzione del citocromo C.

Il dosaggio si effettua spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 550 nm, utilizzando il metodo descritto da Flohè ed Ötting [Flohè L e Ötting F, 1984].

Si incubano per dieci minuti i mitocondri, diluiti 1:10, in una soluzione contenente  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, EDTA 0,1 mM e Triton 0,2%. Al termine dell'incubazione si procede alla misura del campione, utilizzando un buffer costituito da  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, EDTA 0,1 mM, KCN 2 mM, xantina 0,1 mM, NaOH 0,1 mM, citocromo C 20 mM e 0,0033 U/ml di xantina ossidasi.

Viene effettuata anche una misura della riduzione del citocromo C in un bianco, misura effettuata con tutti i reagenti tranne il campione.

Si costruisce poi una curva di calibrazione in cui il reciproco delle variazioni di assorbanza al minuto del citocromo C è riportato in funzione della concentrazione di proteine del campione e si ottiene una relazione di tipo lineare, dalla quale è possibile ricavare l'attività del campione, espressa come Unità/mg di proteine, sapendo che una Unità di superossido dismutasi è definita come la quantità di enzima che inibisce del 50% la riduzione del citocromo C.

## **Determinazione dei livelli plasmatici di NEFA**

Il sangue prelevato in seguito alla decapitazione dell'animale è stato messo in provette contenenti EDTA e tenuto in ghiaccio dopodiché è stato centrifugato alla velocità di 2000 g per 8 minuti, alla temperatura di 4°C.

Applicando questa procedura è stato possibile separare il plasma, rappresentato dal surnatante, dalla parte corpuscolata del sangue, cioè il pellet.

I campioni di plasma sono stati conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento in cui sono stati utilizzati per la determinazione delle misure di interesse. In particolare si è provveduto alla misura dei livelli plasmatici di NEFA, glucosio e insulina.

I NEFA sono stati valutati mediante un metodo enzimatico colorimetrico usando un kit commerciale (Roche Diagnostic, Italia). Il metodo si basa sul meccanismo secondo cui i NEFA plasmatici, in presenza di adenosina-5'-trifosfato (ATP), coenzima A (CoA) ed in presenza dell'enzima acil-CoA sintetasi, sono convertiti in Acil-CoA più pirofosfato ed adenosina-5'-monofosfato. L'acil-CoA reagisce con l'ossigeno, in presenza di una ossidasi, formando enoil-CoA e perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). E' quest'ultimo che poi, reagendo con l'acido 2,4,6-tribromo-3-idrossibenzoico (TBHB) e 4-amminoantipirina (4-AA), dà luogo ad una soluzione rossa che è letta nel visibile a 546 nm.

I campioni di plasma sono stati letti allo spettrofotometro e dall'assorbanza risultante è stato sottratto il valore di assorbanza relativo al solo bianco; la differenza che ne scaturisce è stata utilizzata per determinare la concentrazione in mmol/L di NEFA plasmatico secondo la relazione di Lambert e Beer:

$$A = c \times \varepsilon \times d$$

c = concentrazione in mmol/L

A = assorbanza

d = lunghezza del cammino ottico (espresso in cm)

$\varepsilon$  =coefficiente di estinzione molare.

### **Determinazione dei livelli plasmatici di glucosio e insulina**

I livelli di glucosio sono stati valutati mediante un metodo enzimatico colorimetrico usando un kit commerciale (Pokler, Italia). Tale metodo si basa sul meccanismo secondo cui il glucosio reagisce con l'ossigeno, in presenza di una ossidasi, formando D-glucosio e perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Quest'ultimo ad opera della perossidasi (POD) va ad ossidare il sistema cromogeno costituito da acido p-idrossibenzoico e 4-amminoantipirina (4-AA) con formazione di un composto colorato la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità di glucosio presente nel campione.

I campioni di plasma sono stati letti allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 510 nm, tale assorbanza è stata divisa per l'assorbanza e moltiplicata per la concentrazione dello standard (100mg/dl) determinando la concentrazione in mg/dl di glucosio plasmatico.

I livelli di insulina sono stati, infine, determinati mediante il dosaggio ELISA usando un kit commerciale (Mercodia, Svezia). Tale dosaggio immunoenzimatico sfrutta il metodo del doppio anticorpo (sandwich) ed utilizza come enzima coniugato la perossidasi di rafano.

Le reazioni vengono eseguite in pozzetti di piastre in polistirene al cui interno sono adesi gli anticorpi anti-insulina. Dopo la rimozione dell'eccesso di materiale mediante opportuni lavaggi, ai pozzetti "sensibilizzati" sono aggiunti in successione gli altri reagenti intervallati da lavaggi in grado di rimuovere ogni traccia di materiale che non si sia legato al reagente precedente. Per ultimo si aggiunge il substrato della perossidasi sviluppando un composto colorato la cui intensità è proporzionale alla quantità di enzima presente.

La quantificazione della concentrazione dell'insulina nei campioni di plasma è stata effettuata confrontando l'assorbanza dei pozzetti contenenti campioni con quella di soluzione a concentrazione nota di insulina (standard). Infatti, riportando in grafico l'assorbanza degli standard in funzione della loro concentrazione, si ottiene una curva di calibrazione



mediante la quale è possibile determinare la concentrazione di insulina nel campione analizzato.

La resistenza all'insulina è stata valutata dall'indice HOMA =  $[\text{Glucosio (mg/dL)} \times \text{Insulina (mU/L)}]/405$ .

### **Analisi statistica**

I dati sono le medie  $\pm$  ES di otto differenti ratti. Le analisi statistiche sono state compiute mediante l'uso del test T di Student. Il confronto tra le cinetiche della conduttanza protonica basale e indotta è stato effettuato tramite l'applicazione della regressione non lineare. Valori di probabilità minori di 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi. Tutte le analisi sono state effettuate usando il programma GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

# **RISULTATI**

## Disegno sperimentale 1: 24h digiuno

I risultati relativi alle misure della respirazione mitocondriale sulle due popolazioni del muscolo scheletrico (mitocondri SS e IMF) nei ratti a digiuno e in quelli alimentati sono mostrati nella *tabella 2*, nella quale è riportato sia lo Stato 3 che 4 della respirazione, espresso in ngatomi di ossigeno consumato al minuto per mg di proteine mitocondriali, sia il rapporto respiratorio (RCR), cioè il rapporto tra lo Stato 3 e lo Stato 4 della respirazione. In entrambe le popolazioni mitocondriali, usando il succinato più rotenone come substrato, non è stata trovata alcuna variazione significativa dello Stato 3 e 4 della respirazione nella transizione dallo stato alimentato a quello di digiuno. I valori di RCR indicano per entrambe le frazioni mitocondriali che le condizioni di isolamento dei mitocondri non hanno pregiudicato la loro funzionalità. Nella *tabella 2* sono anche riportati i risultati relativi al grado di accoppiamento termodinamico ( $q$ ) e all'efficienza termodinamica ottimale ( $\eta$ ). Nei ratti a digiuno si osserva un decremento significativo di questi parametri per i mitocondri SS, mentre non si osserva alcuna variazione rispetto ai ratti alimentati per i mitocondri IMF.

Nella *figura 8* sono riportati i risultati della cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri SS e IMF del muscolo scheletrico isolati dai ratti alimentati e a digiuno. I dati mostrano che in seguito al digiuno la

cinetica della conduttanza protonica basale aumenta in modo significativo nei mitocondri SS, in quanto ad ogni valore del consumo di ossigeno il potenziale di membrana rimane ad un valore più basso nei ratti a digiuno rispetto ai ratti alimentati. Nei mitocondri IMF isolati da ratti a digiuno non si osserva, invece, alcuna variazione significativa rispetto ai ratti alimentati.

Nella *figura 9* è riportata la conduttanza protonica indotta dal palmitato come cinetica delle variazioni del potenziale di membrana in funzione delle variazioni della respirazione. Nei ratti a digiuno non si osserva alcuna variazione significativa per i mitocondri IMF rispetto ai ratti alimentati, mentre per i mitocondri SS si osserva una conduttanza protonica indotta maggiore rispetto ai ratti alimentati, in quanto ad ogni valore del consumo di ossigeno il potenziale di membrana rimane ad un valore più basso nei ratti a digiuno rispetto ai ratti alimentati.

Nella *figura 10* sono riportati i risultati relativi al grado di accoppiamento termodinamico ( $q$ ) e all'efficienza termodinamica ottimale ( $\eta$ ) ottenuti in presenza di palmitato. Nei ratti a digiuno si osserva un decremento significativo di questi parametri per i mitocondri SS, mentre non si osserva alcuna variazione rispetto ai ratti alimentati per i mitocondri IMF.

Le misure del contenuto di ANT mostrano che sia nei mitocondri SS che in quelli IMF non ci sono significative variazioni nel passaggio dallo stato alimentato a quello di digiuno (*figura 11*).

Ho anche misurato l'attività dell'aconitasi mitocondriale come un indicatore del danno ossidativo in vivo. E' stata misurata sia l'attività dell'aconitasi attiva (livello basale), sia l'attività dell'aconitasi totale ottenuta dopo la riattivazione della frazione inattiva. I risultati sono espressi come rapporto dell'attività dell'aconitasi basale/aconitasi totale. Per i mitocondri SS, questo rapporto è significativamente più alto nei ratti a digiuno in confronto ai ratti alimentati (*tabella 3*). Questo risultato indica che i mitocondri SS isolati dai ratti a digiuno rivelano un danno ossidativo minore rispetto ai ratti alimentati. D'altra parte, non ci sono differenze del rapporto dell'attività dell'aconitasi basale/aconitasi totale tra i mitocondri IMF isolati dai ratti alimentati e quelli isolati dai ratti a digiuno (*tabella 3*). Si può, inoltre, notare che non sono state trovate differenze nell'attività dell'aconitasi totale dopo riattivazione nei mitocondri IMF, quindi, diversamente dai mitocondri SS, quelli IMF isolati dai ratti alimentati e a digiuno contengono una quantità simile di aconitasi totale (*tabella 3*). Nella stessa tabella sono mostrati i risultati dell'attività specifica della SOD; i valori non sono significativamente differenti nel passaggio dallo stato alimentato a quello di digiuno, sia nei mitocondri SS sia in quelli IMF.

In *figura 12* è riportato il contenuto della proteina UCP3, misurato mediante Western blot in entrambe le popolazioni mitocondriali isolate da ratti alimentati e a digiuno. I risultati mostrano un aumento significativo del contenuto di UCP3 sia nei mitocondri SS sia in quelli IMF isolati da ratti a digiuno rispetto ai ratti alimentati.

## **Disegno sperimentale 2: restrizione calorica**

I dati sul peso, sulla quantità di proteine e lipidi corporei, nonché sulla spesa energetica netta dei ratti a restrizione calorica (FR) e dei controlli dello stesso peso (WM) sono riportati nella *tabella 4*. Al termine delle due settimane di restrizione calorica, durante le quali la crescita si arresta, il peso corporeo, così come le proteine, sono uguali nei ratti FR rispetto ai controlli WM; mentre le riserve lipidiche dei ratti FR risultano essere significativamente ridotte. Per quanto riguarda la spesa energetica, essa è significativamente più bassa nei ratti FR rispetto ai controlli WM.

I risultati relativi alle misure della respirazione mitocondriale, in presenza di un substrato NAD dipendente quale il glutammato, un substrato FAD dipendente quale il succinato ed un substrato lipidico quale il palmitoil-CoA, sulle due popolazioni del muscolo scheletrico nei ratti a restrizione calorica e in quelli di controllo sono riportati in *tabella 5*. Alla fine della restrizione calorica, lo Stato 3 dell'attività respiratoria dei mitocondri SS è

significativamente più basso nei ratti a restrizione calorica rispetto ai controlli WM con il glutammato e il succinato, mentre non si osserva una variazione significativa per i mitocondri IMF. Nessuna variazione significativa dello Stato 4 dell'attività respiratoria è stata trovata in entrambe le popolazioni mitocondriali dei ratti a restrizione calorica rispetto ai controlli WM.

Nella *figura 13* sono riportati i risultati della cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri di muscolo di ratti a restrizione calorica (FR) e dei controlli dello stesso peso (WM). I dati mostrano che, in seguito alla restrizione calorica, la cinetica della conduttanza protonica basale non subisce alcuna variazione significativa in entrambe le frazioni mitocondriali.

Nella *figura 14* è invece riportata la conduttanza protonica indotta dal palmitato come cinetica delle variazioni del potenziale di membrana in funzione delle variazioni della respirazione. Nei ratti FR non si osserva alcuna variazione significativa per i mitocondri SS rispetto ai controlli WM, mentre per gli IMF si osserva una conduttanza protonica indotta minore rispetto a quella dei ratti di controllo WM, in quanto ad ogni valore di consumo di ossigeno il potenziale di membrana rimane ad un valore più alto nei ratti FR rispetto ai ratti di controllo WM.

Il contributo dei vari sistemi proteici mitocondriali responsabili dell'effetto disaccoppiante del palmitato è riportato nella *tabella 6*, i risultati mostrano che nei mitocondri IMF e SS dei ratti FR, la diminuzione del potenziale di membrana può essere abolita completamente dall'aggiunta di CAT, uno specifico inibitore dell'ANT; mentre, nei ratti di controllo WM, l'ANT, il carrier del glutammato/aspartato ed altri trasportatori sono tutti coinvolti nella suddetta diminuzione.

In *figura 15* è riportato il contenuto della proteina UCP3, misurato mediante Western blot in entrambe le popolazioni mitocondriali. I risultati non mostrano alcuna variazione significativa nei ratti FR rispetto ai controlli WM.

In *figura 16* sono riportati i risultati relativi al grado di accoppiamento termodinamico ( $q$ ) e all'efficienza termodinamica ottimale ( $\eta$ ). Per i ratti FR si osserva un decremento significativo di entrambi i parametri per i mitocondri SS, mentre non si osserva alcuna variazione rispetto ai controlli WM per i mitocondri IMF.

Nella *figura 17* è riportata l'attività della citrato sintasi, un marker enzimatico mitocondriale, usato per la determinazione della massa proteica mitocondriale, e l'attività specifica della citrato sintasi. Alla fine della restrizione calorica l'attività della citrato sintasi/g di tessuto è significativamente più bassa nei ratti FR rispetto ai controlli WM, sia



nell'omogenato che nei mitocondri SS ed IMF isolati dal muscolo scheletrico. Invece, nessuna differenza significativa dell'attività specifica della citrato sintasi/mg di proteine è stata ottenuta nei mitocondri SS e IMF. Nella *figura 18* è riportata la resa dei mitocondri SS ed IMF, espressa in mg/g tessuto, e il recupero dell'attività della citrato sintasi. I risultati mostrano che la resa mitocondriale è più bassa nei ratti FR rispetto ai ratti di controllo WM per entrambe le popolazioni mitocondriali, ed inoltre il recupero dell'attività della citrato sintasi non è variato nei ratti FR rispetto ai controlli WM. Questi risultati nel loro insieme indicano che la massa proteica mitocondriale del muscolo scheletrico è ridotta alla fine delle due settimane di restrizione calorica.

In *figura 19* è riportata l'attività specifica dell'aconitasi, espressa in mU/mg di proteine, e della superossido dismutasi (SOD), espressa in U/mg di proteine, esse erano misurate come indice del danno ossidativo cellulare e delle difese antiossidanti, rispettivamente. Per entrambe le frazioni mitocondriali non si osservano variazioni dell'attività specifica dell'aconitasi nei ratti FR rispetto ai ratti di controllo WM. Mentre si osserva un incremento significativo dell'attività specifica della SOD per i mitocondri SS e IMF dei ratti FR rispetto ai controlli WM.

La caratterizzazione metabolica dei ratti FR rispetto ai ratti di controllo WM è stata ottenuta dalla misura dei livelli plasmatici di NEFA, insulina e

glucosio. Tali risultati, riportati nella *tabella 7*, mostrano che i livelli plasmatici di NEFA e glucosio sono significativamente più bassi nei ratti FR rispetto ai ratti di controllo WM, mentre nessuna differenza è stata trovata per i livelli plasmatici di insulina. Inoltre, nella *tabella 8* è stato riportato l'indice HOMA, un indicatore del livello di resistenza all'insulina, che nei ratti FR rispetto ai ratti di controllo WM è significativamente più basso.

### **Disegno sperimentale 3: rialimentazione**

I dati sul peso, sulla quantità di proteine e lipidi corporei dei due gruppi del disegno sperimentale sono riportati nella *tabella 8*. Al termine della settimana di rialimentazione, durante le quali i ratti RF introducono la stessa quantità di cibo dei controlli WM, tra i due gruppi non si osservano differenze significative nel peso corporeo finale e nella componente proteica. Al contrario i lipidi sono notevolmente aumentati nei ratti RF, rispetto ai controlli WM.

Nella *tabella 9* sono riportati i risultati ottenuti dalle misure del bilancio energetico durante la rialimentazione. In particolare si osserva che, mentre non ci sono variazioni significative nell'energia metabolizzabile introdotta nei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM, il guadagno energetico risulta aumentato significativamente, mentre la spesa energetica e la spesa energetica netta sono significativamente diminuite nei ratti RF rispetto ai

ratti WM. L'accumulo preferenziale di grasso corporeo, quindi, nei ratti RF è dovuto ad un significativo aumento della loro efficienza energetica. Infine nella *tabella 9* è stato riportato il rapporto spesa energetica netta/energia metabolizzabile, indice d'inefficienza metabolica, che nei ratti RF rispetto ai controlli WM è significativamente più basso, in accordo con i dati precedenti.

I risultati relativi alle misure della respirazione mitocondriale sulle due popolazioni del muscolo scheletrico, nei ratti RF e in quelli di controllo WM sono riportati nella *tabella 10*. Alla fine della rialimentazione, lo Stato 3 dell'attività respiratoria dei mitocondri SS è significativamente più basso nei ratti RF rispetto ai controlli WM con il glutammato e il palmitoil-CoA, ma non con il succinato. Mentre nei mitocondri IMF lo Stato 3 dell'attività respiratoria tende ad essere significativamente più alta nei ratti RF rispetto ai controlli WM utilizzando come substrato il succinato. Nessuna variazione significativa dello Stato 4 dell'attività respiratoria è stata trovata in entrambe le popolazioni mitocondriali dei ratti rialimentati rispetto ai controlli WM.

Nella *figura 20* sono riportati i risultati della cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri di muscolo di ratti rialimentati per una settimana (RF) e dei controlli dello stesso peso (WM). I dati mostrano che, in seguito alla rialimentazione, la cinetica della conduttanza protonica

basale non subisce alcuna variazione significativa nei mitocondri SS mentre risulta essere più alta per i mitocondri IMF dei ratti RF rispetto ai controlli WM, in quanto ad ogni valore di consumo di ossigeno il potenziale di membrana risulta essere più basso nei ratti RF rispetto ai controlli WM.

Nella *figura 21* è invece riportata la conduttanza protonica indotta dal palmitato come cinetica delle variazioni del potenziale di membrana in funzione delle variazioni della respirazione. I dati mostrano che, in seguito alla rialimentazione, la cinetica della conduttanza protonica indotta risulta essere più alta per entrambe le popolazioni mitocondriali dei ratti RF rispetto ai controlli WM, in quanto ad ogni valore di consumo di ossigeno il potenziale di membrana risulta essere più basso nei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM.

Il contributo dei vari sistemi proteici mitocondriali responsabili dell'effetto disaccoppiante del palmitato è riportato nella *tabella 11*, i risultati mostrano che nei mitocondri IMF e SS dei ratti RF e dei relativi controlli WM, la diminuzione del potenziale di membrana può essere abolita principalmente dall'aggiunta di CAT, uno specifico inibitore dell'ANT, mentre in piccola parte dal carrier del glutammato/aspartato.

Nella *tabella 12* è riportato il contenuto della proteina UCP3, misurato mediante Western blot in entrambe le popolazioni mitocondriali. I risultati

non mostrano alcuna variazione significativa nei ratti RF rispetto ai controlli WM.

In *figura 22* sono riportati i risultati relativi al grado di accoppiamento termodinamico ( $q$ ) e all'efficienza termodinamica ottimale ( $\eta$ ). Per i ratti RF non si osservano variazioni significative di entrambi i parametri per i mitocondri SS e IMF rispetto ai controlli WM.

Nella *figura 23* è riportata l'attività della citrato sintasi, un marker enzimatico mitocondriale, usato per la determinazione della massa proteica mitocondriale, e l'attività specifica della citrato sintasi. Alla fine della rialimentazione l'attività della citrato sintasi/g di tessuto è più bassa nei ratti RF rispetto ai controlli WM, sia nell'omogenato sia nei mitocondri SS ed IMF isolati dal muscolo scheletrico. Queste differenze sono significative per l'omogenato e i mitocondri SS ma non per i mitocondri IMF. Invece, nessuna differenza significativa dell'attività specifica della citrato sintasi/mg di proteine è stata ottenuta nei mitocondri SS e IMF. Nella *figura 24* è riportata la resa dei mitocondri SS ed IMF, espressa in mg/g tessuto, e il recupero dell'attività della citrato sintasi. I risultati mostrano che la resa mitocondriale è più bassa nei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM per entrambe le popolazioni mitocondriali, tali differenze sono più pronunciate e statisticamente significative per i mitocondri SS mentre nessuna significatività è stata riscontrata per i mitocondri IMF. Il

recupero dell'attività della citrato sintasi non è variato nei ratti RF rispetto ai controlli WM. Questi risultati indicano che la massa mitocondriale del muscolo scheletrico, ed in particolare la massa dei mitocondri SS, è ridotta alla fine della settimana di restrizione calorica.

In *figura 25* è riportata l'attività specifica dell'aconitasi, espressa in mU/mg di proteine, e della superossido dismutasi, espressa in U/mg di proteine. Per entrambe le frazioni mitocondriali si osserva una significativa diminuzione dell'attività specifica dell'aconitasi nei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM. Mentre si osserva un incremento significativo dell'attività specifica della SOD solo per i mitocondri SS dei ratti RF rispetto ai controlli WM.

La caratterizzazione metabolica dei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM è stata ottenuta dalla misura dei livelli plasmatici di NEFA, insulina e glucosio. Tali risultati, riportati nella *tabella 13*, mostrano che non c'è alcuna variazione dei livelli plasmatici di NEFA e di insulina nei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM, mentre si osserva un aumento significativo sia per i livelli di glucosio e che per l'indice HOMA, un indicatore del livello di resistenza all'insulina, nei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM.

**Tabella 2**

**Attività respiratoria nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) del muscolo scheletrico isolati dai ratti alimentati e a digiuno**

|            |                | <b>Alimentati</b> | <b>A digiuno</b> |
|------------|----------------|-------------------|------------------|
| <b>SS</b>  | <b>Stato 3</b> | 383±20            | 344±30           |
|            | <b>Stato 4</b> | 82±8              | 82±6             |
|            | <b>RCR</b>     | 4,7±0,2           | 4,2±0,2          |
|            | <b>q</b>       | 0,902±0,002       | 0,873±0,007*     |
|            | <b>η</b>       | 0,396±0,003       | 0,345±0,005*     |
| <b>IMF</b> | <b>Stato 3</b> | 670±15            | 627±15           |
|            | <b>Stato 4</b> | 126±3             | 114±10           |
|            | <b>RCR</b>     | 5,3±0,1           | 5,2±0,2          |
|            | <b>q</b>       | 0,913±0,001       | 0,911±0,002      |
|            | <b>η</b>       | 0,396±0,002       | 0,418±0,001      |

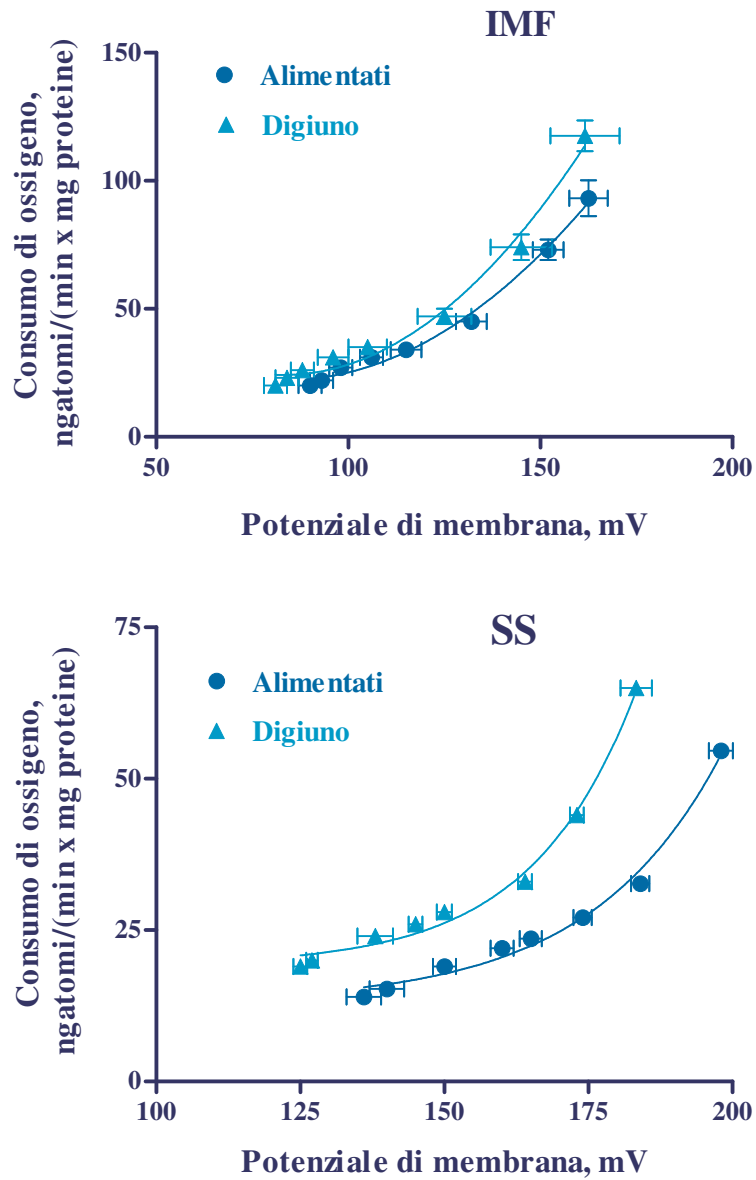
I valori sono le medie ± ES di otto differenti esperimenti.

Le velocità dello stato 3 e dello stato 4 della respirazione mitocondriale sono espresse come ngatomi di O/(min x mg di proteine); RCR: rapporto del controllo respiratorio; q: grado di accoppiamento termodinamico; η: efficienza ottimale.

\* P<0,05 rispetto ai ratti alimentati.

**Figura 8**

**Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti alimentati e a digiuno**

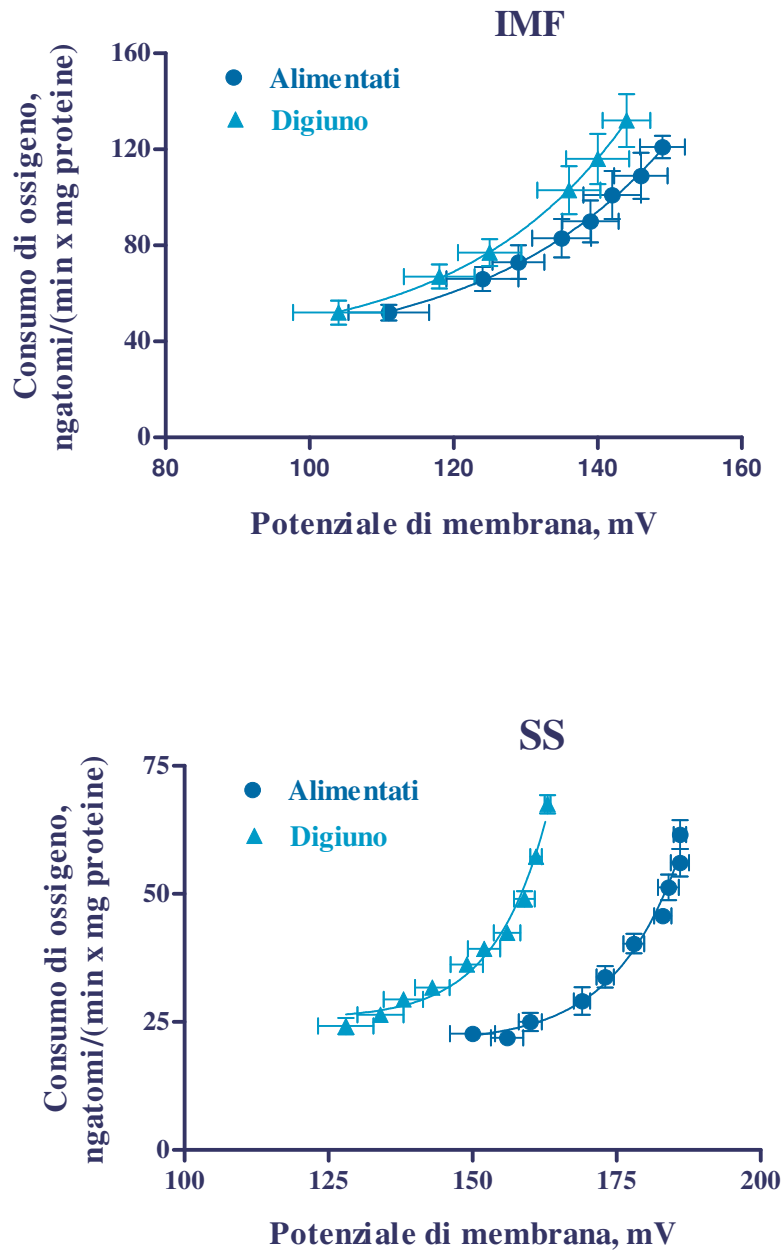


Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.



**Figura 9**

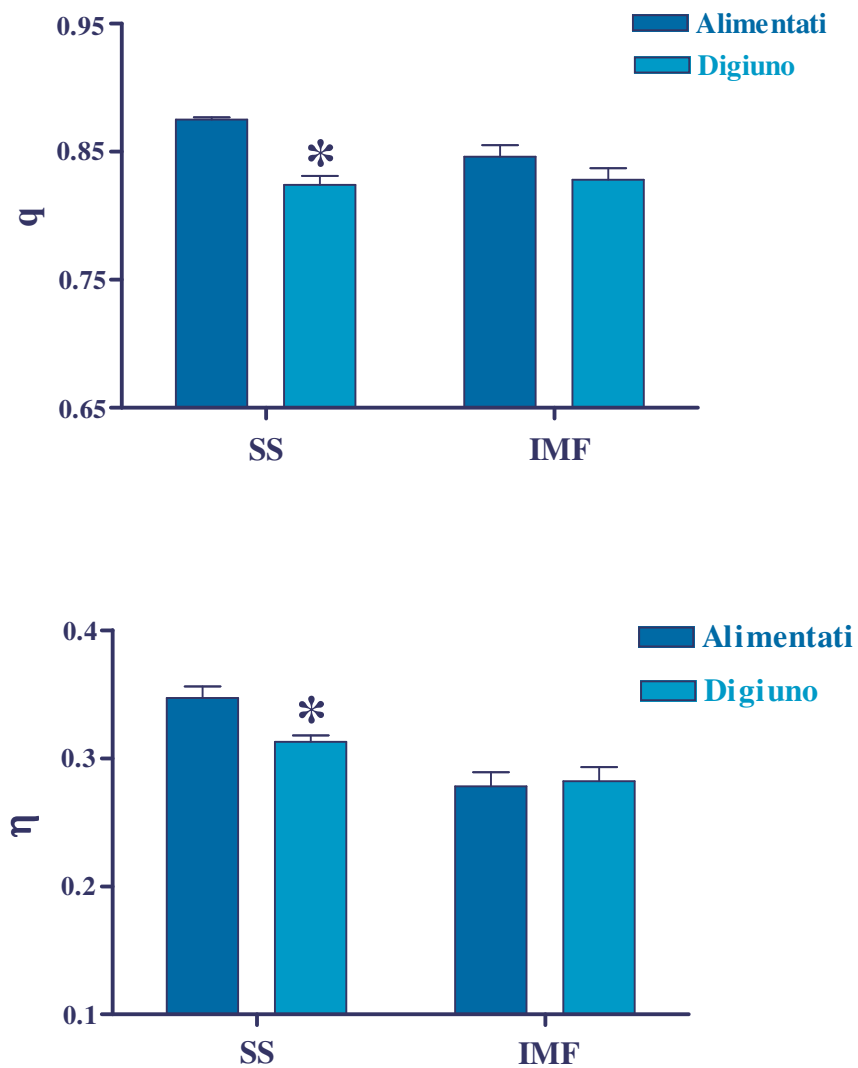
**Cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti alimentati e a digiuno**



Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

**Figura 10**

**Misura del grado di accoppiamento termodinamico ( $q$ ) e dell'efficienza termodinamica ottimale ( $\eta$ ) in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti alimentati e a digiuno**

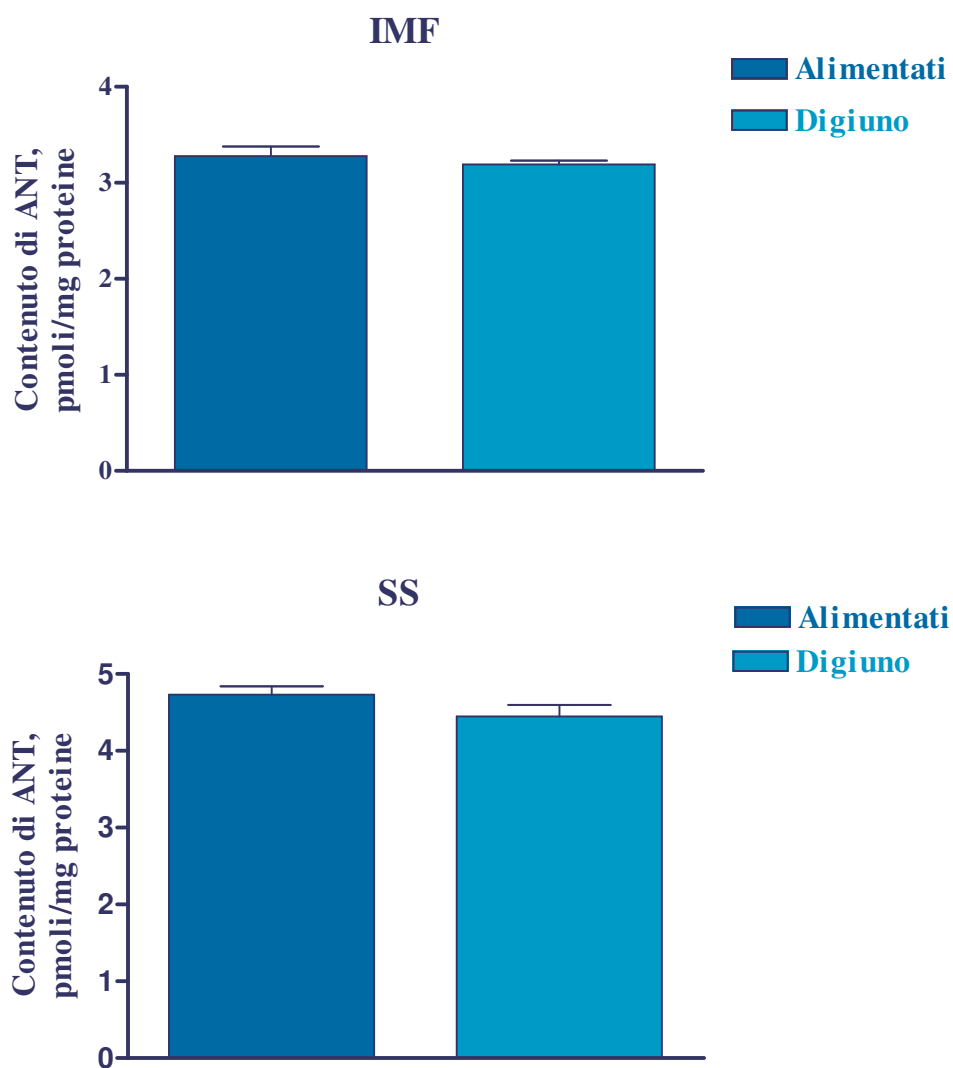


I valori sono le medie  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai ratti alimentati.

**Figura 11**

**Contenuto proteico di ANT nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti alimentati e a digiuno**



I valori sono le medie  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

**Tabella 3**

**Attività dell'aconitasi e della SOD nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) del muscolo scheletrico isolati dai ratti alimentati e a digiuno**

|            |   | <b>Alimentati</b> | <b>A digiuno</b> |
|------------|---|-------------------|------------------|
| <b>SS</b>  | <b>Attività specifica dell'aconitasi basale (mU/mg di proteine)</b> | 46±4              | 47±2             |
|            | <b>Attività specifica dell'aconitasi totale (mU/mg di proteine)</b> | 157±8             | 126±6*           |
|            | <b>Aconitasi basale/totale</b>                                      | 0,30±0,02         | 0,37±0,02*       |
|            | <b>Attività specifica della SOD (U/mg di proteine)</b>              | 15±1              | 16±1             |
| <b>IMF</b> | <b>Attività specifica dell'aconitasi basale (mU/mg di proteine)</b> | 17±2              | 16±1             |
|            | <b>Attività specifica dell'aconitasi totale (mU/mg di proteine)</b> | 106±6             | 103±2            |
|            | <b>Aconitasi basale/totale</b>                                      | 0,16±0,01         | 0,16±0,01        |
|            | <b>Attività specifica della SOD (U/mg di proteine)</b>              | 13±2              | 12±2             |

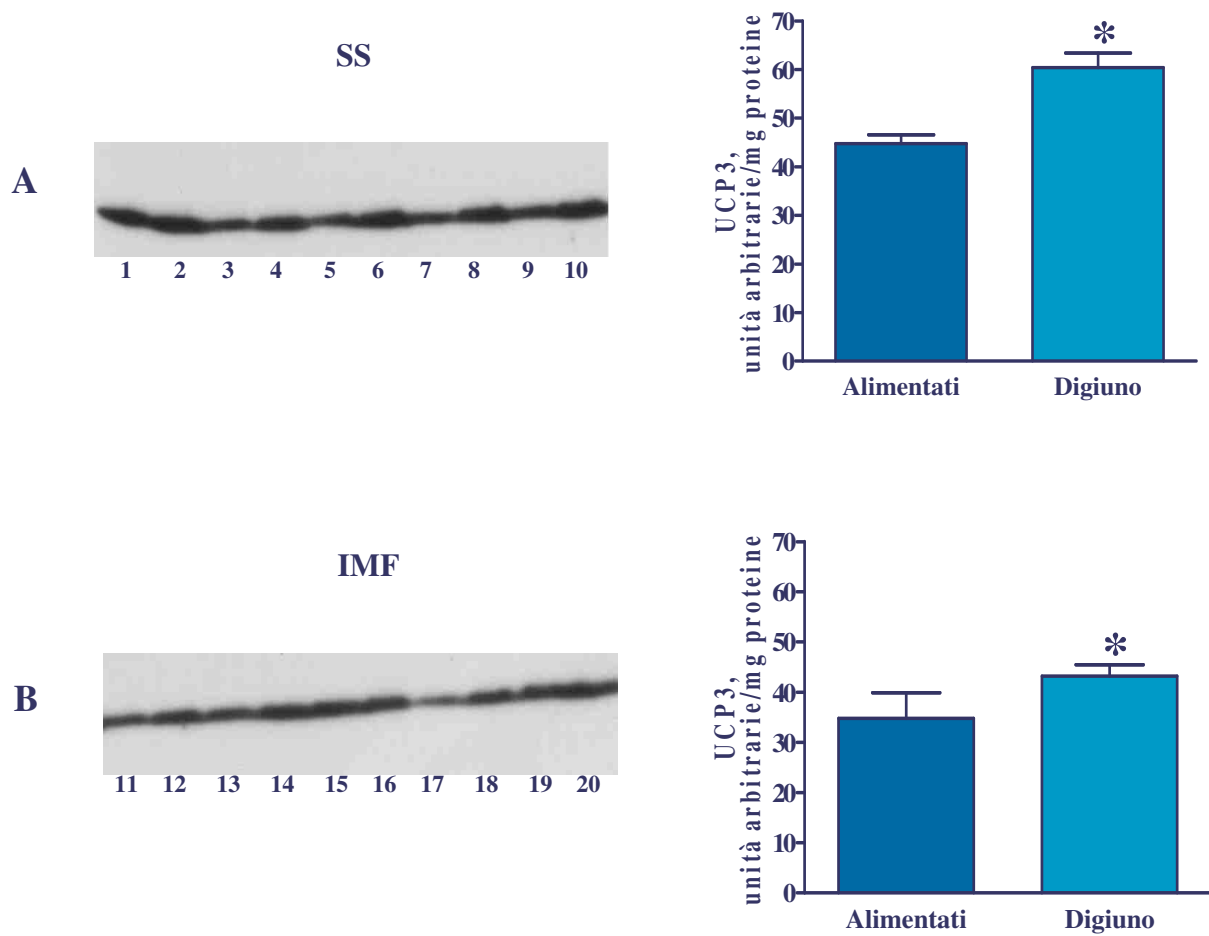
I valori sono le medie ± ES di otto differenti esperimenti.

SOD: superossido dismutasi.

\* P<0,05 rispetto ai ratti alimentati.

**Figura 12**

**Misura del contenuto della proteina UCP3 nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti alimentati e a digiuno**



I valori sono le medie  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

**Tabella 4**

**Composizione corporea, del contenuto di proteine e lipidi nei ratti a restrizione calorica (FR) e nei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

|                                   | <b>WM</b> | <b>FR</b> |
|-----------------------------------|-----------|-----------|
| <b>Peso corporeo, g</b>           | 222,2±2,8 | 222,5±2,1 |
| <b>Contenuto lipidico, g</b>      | 18,2±1,3  | 8,7±1,1*  |
| <b>Contenuto proteico, g</b>      | 45,7±1,8  | 47,0±1,2  |
| <b>Spesa energetica netta, kJ</b> | 2723±136  | 1817±79   |

I valori sono le medie ± ES di quattro differenti esperimenti.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM

**Tabella 5**

**Misura della respirazione in presenza di glutammato, succinato e palmitoil-CoA in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

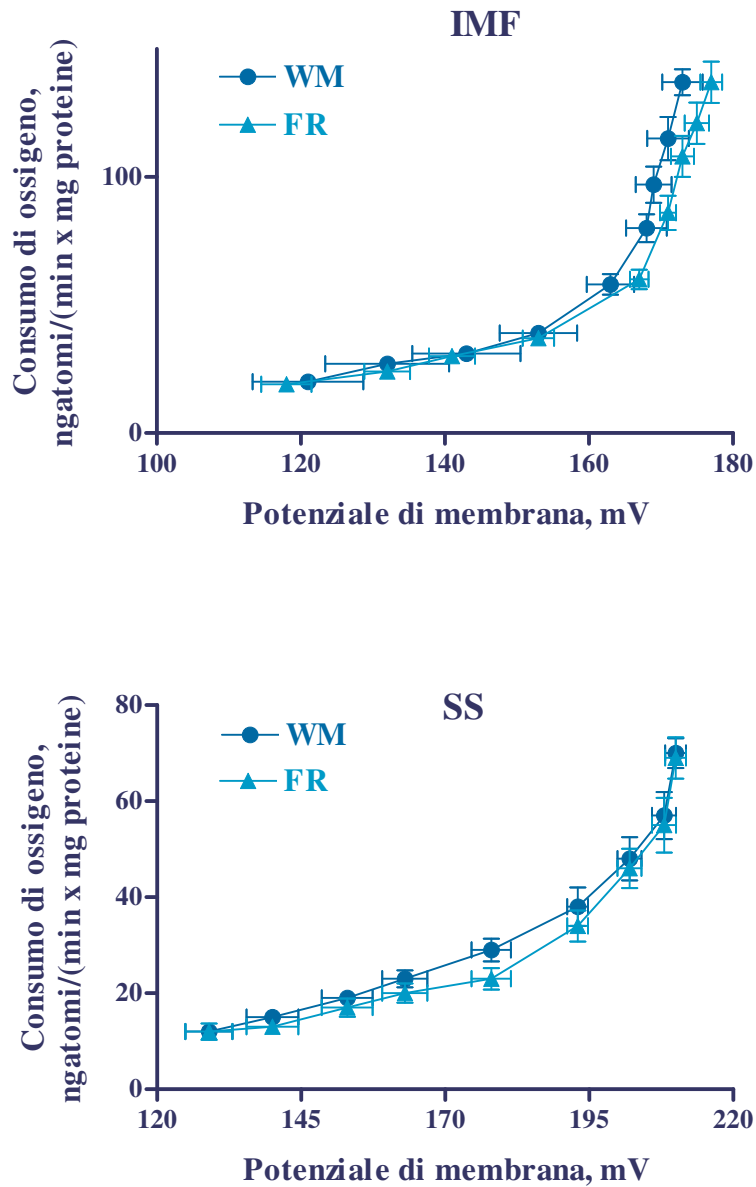
|                      | IMF      |          | SS       |          |
|----------------------|----------|----------|----------|----------|
|                      | WM       | FR       | WM       | FR       |
| <b>Glutammato</b>    |          |          |          |          |
| Stato 3              | 750±50   | 746±30   | 341±20   | 256±21*  |
| Stato 4              | 47,4±2,6 | 46,0±1,3 | 33,8±3,2 | 36,8±2,3 |
| RCR                  | 16,0±1,1 | 16,2±0,6 | 10,3±0,7 | 9,6±0,1  |
| <b>Succinato</b>     |          |          |          |          |
| Stato 3              | 791±29   | 757±16   | 388±9    | 338±13*  |
| Stato 4              | 181±6    | 169±6    | 76,1±2,1 | 77,3±2,3 |
| RCR                  | 4,4±0,1  | 4,5±0,1  | 5,1±0,2  | 4,4±0,1* |
| <b>Palmitoil-CoA</b> |          |          |          |          |
| Stato 3              | 339±11   | 358±22   | 141±4    | 132±7    |
| Stato 4              | 33,5±0,6 | 36,6±1,2 | 29,8±1,4 | 25,4±2,1 |
| RCR                  | 10,1±0,3 | 9,8±0,6  | 4,7±0,2  | 5,3±0,7  |

I valori sono le medie ± ES di sei differenti esperimenti.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM.

**Figura 13**

**Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

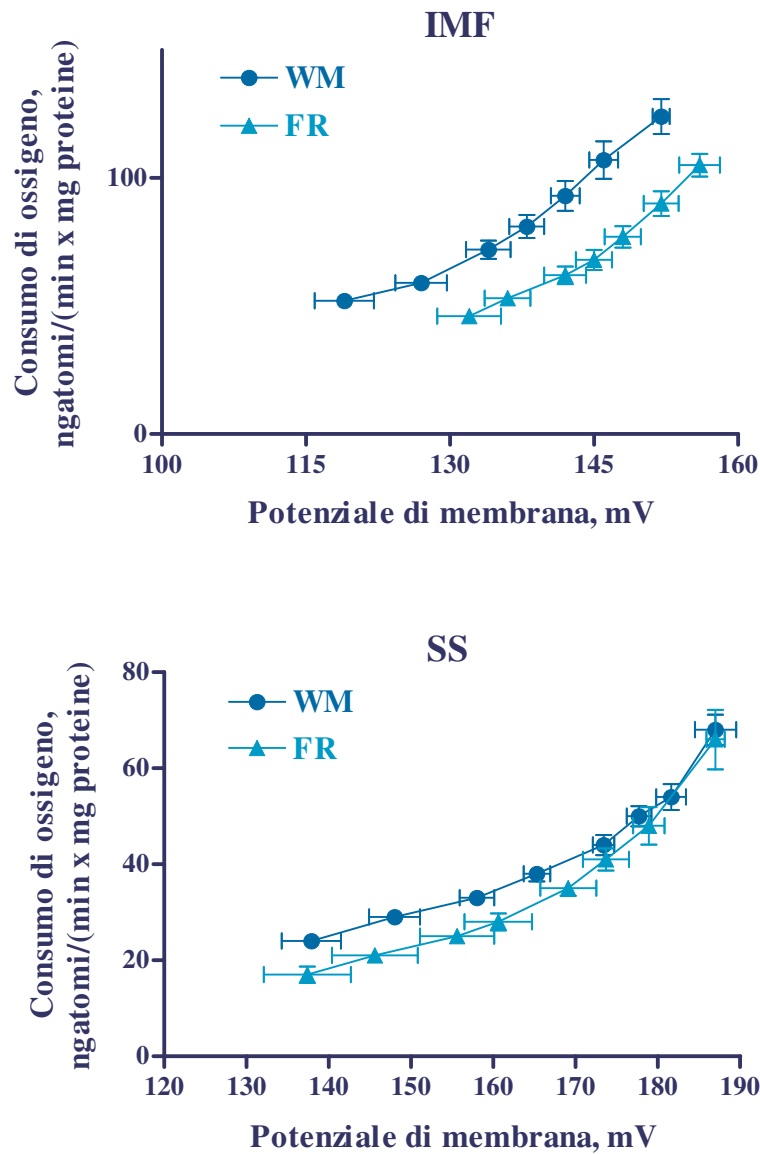


Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  ES di sei differenti esperimenti.



**Figura 14**

**Cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**



Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  ES di sei differenti esperimenti.

**Tabella 6**

**Effetto inibitorio della CAT, del glutammato e della BSA sulla diminuzione del potenziale di membrana indotta dal palmitato nei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcolemmatici (SS) isolati dal muscolo scheletrico di ratti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

| % della diminuzione del potenziale di membrana indotta dal palmitato abolita da: |            | WM   | FR     |
|--|------------|------|--------|
| IMF  | CAT        | 77±3 | 100±3* |
|  | Glutammato | 12±1 | 0±0*   |
|  | BSA        | 11±3 | 0±0*   |
| SS   | CAT        | 50±4 | 100±0* |
|  | Glutammato | 34±3 | 0±0*   |
|  | BSA        | 16±1 | 0±0*   |

I valori sono le medie ± ES di sei differenti esperimenti.

CAT: carbossiatrattiloside.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM.

### Figura 15

Misura del contenuto della proteina UCP3 in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)

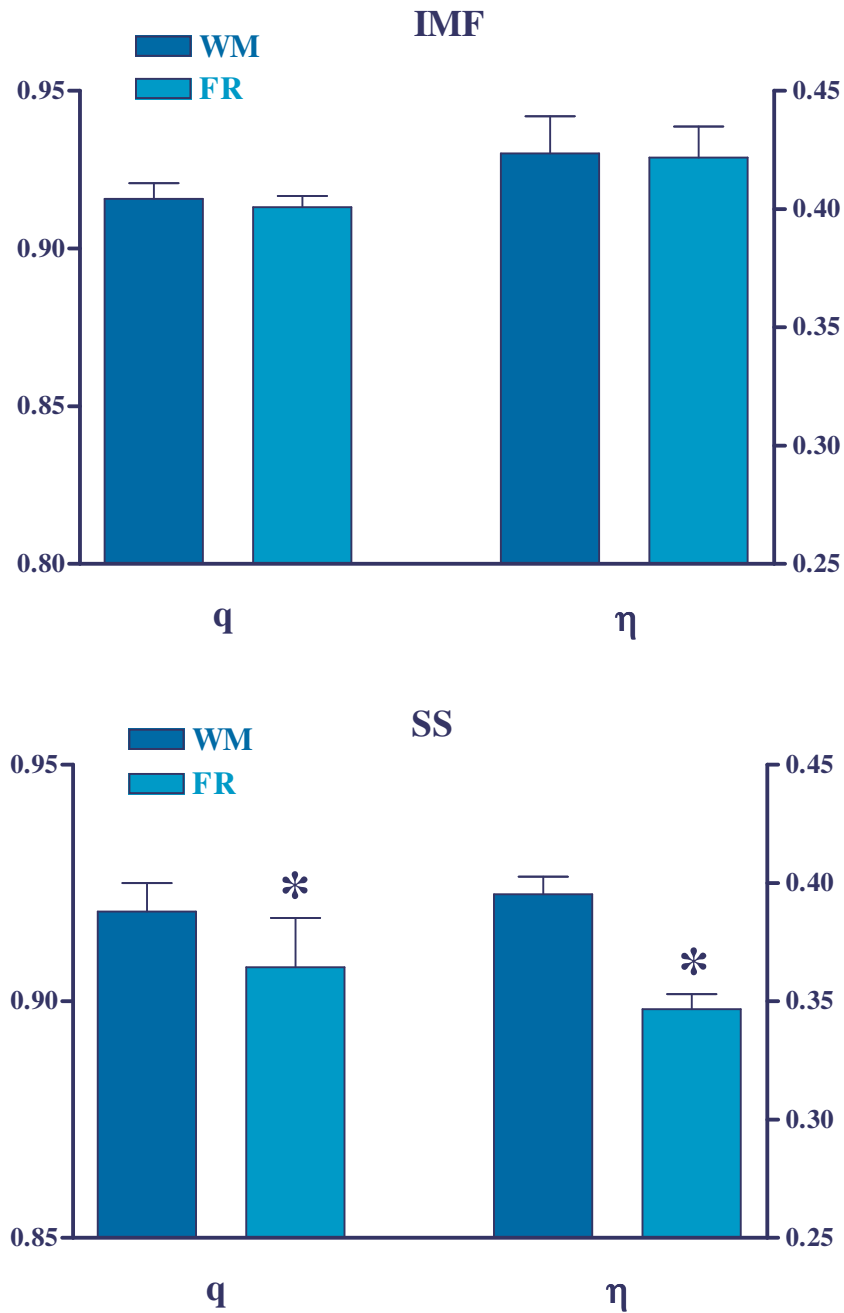
Livelli relativi della proteina UCP3

|     | WM   | FR   |
|-----|------|------|
| SS  | 45±6 | 49±5 |
| IMF | 59±2 | 64±3 |

I valori sono le medie ± ES di quattro differenti campioni e sono espressi in unità arbitrarie/mg di proteine.

**Figura 16**

Misura del grado di accoppiamento termodinamico ( $q$ ) e dell'efficienza termodinamica ottimale ( $\eta$ ) in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)

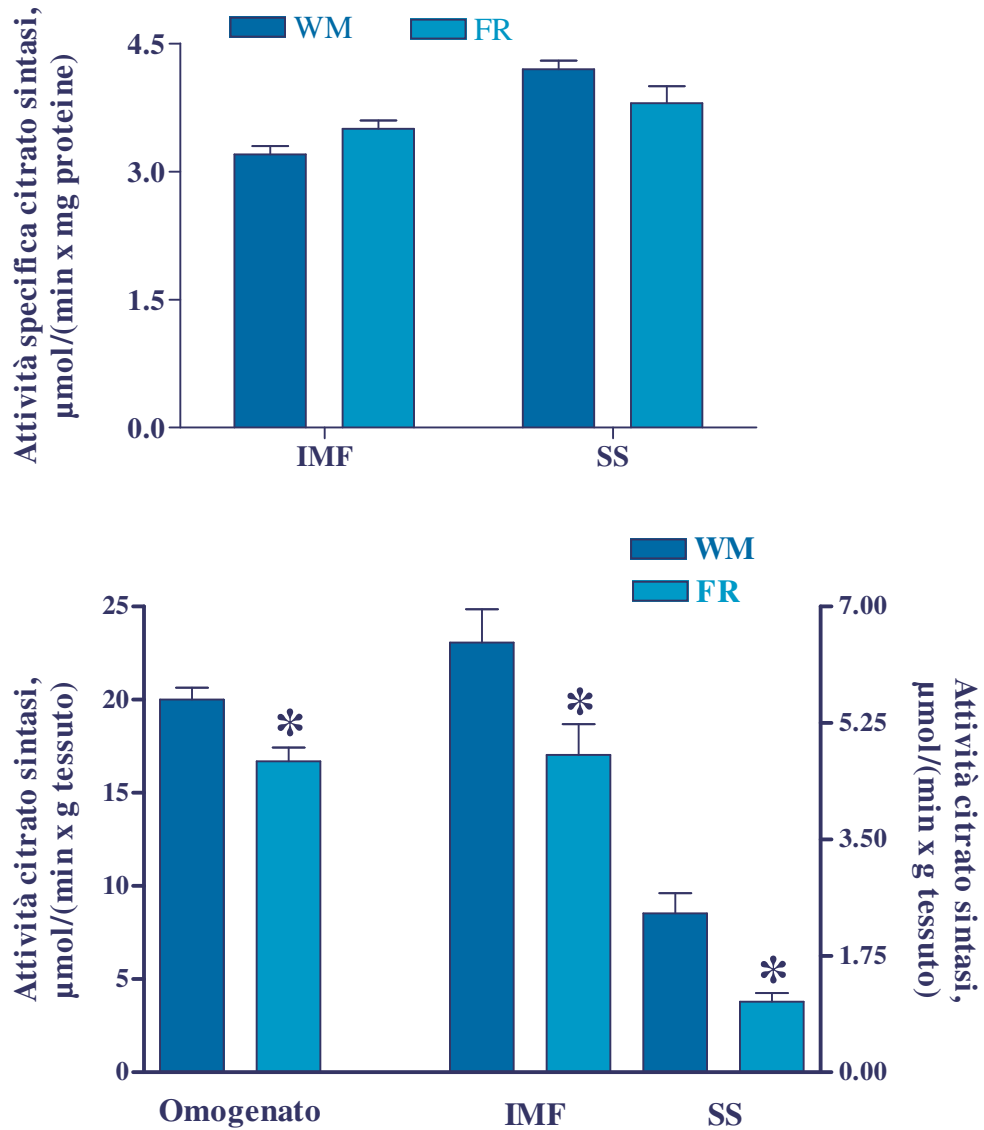


I valori sono le medie  $\pm$  ES di sei differenti esperimenti.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.

**Figura 17**

Attività della citrato sintasi e attività specifica della citrato sintasi nell'omogenato e nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)

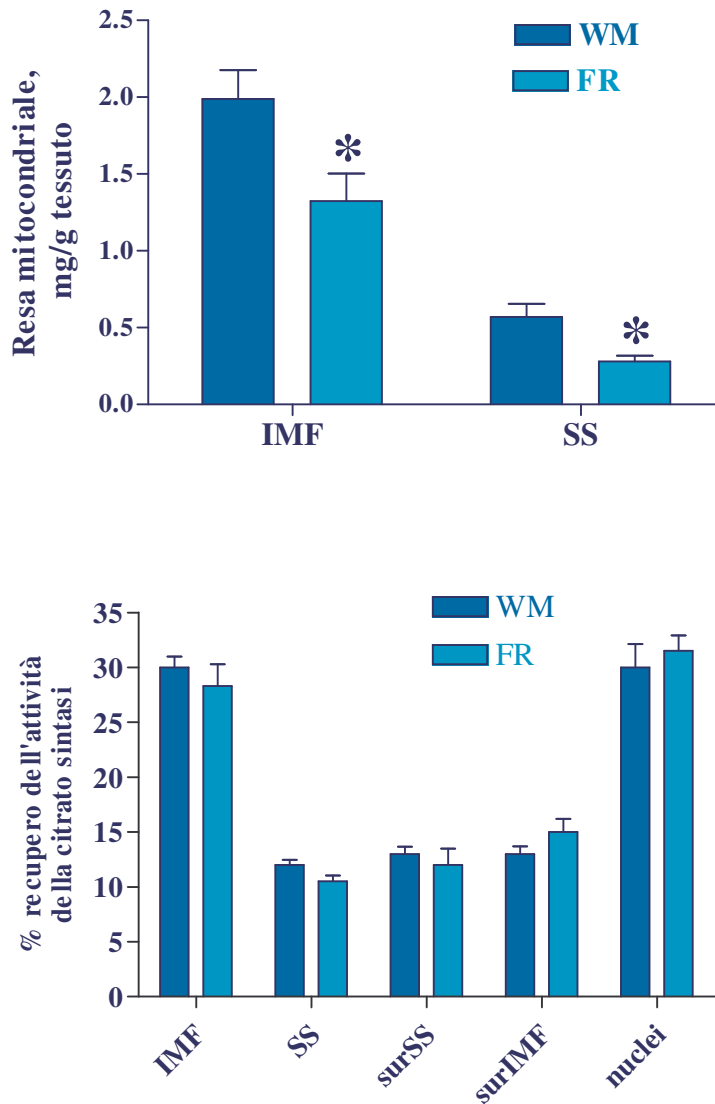


I valori sono le medie  $\pm$  ES di sei differenti esperimenti.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.

**Figura 18**

**Resa proteica mitocondriale e percentuale di recupero dell'attività della citrato sintasi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

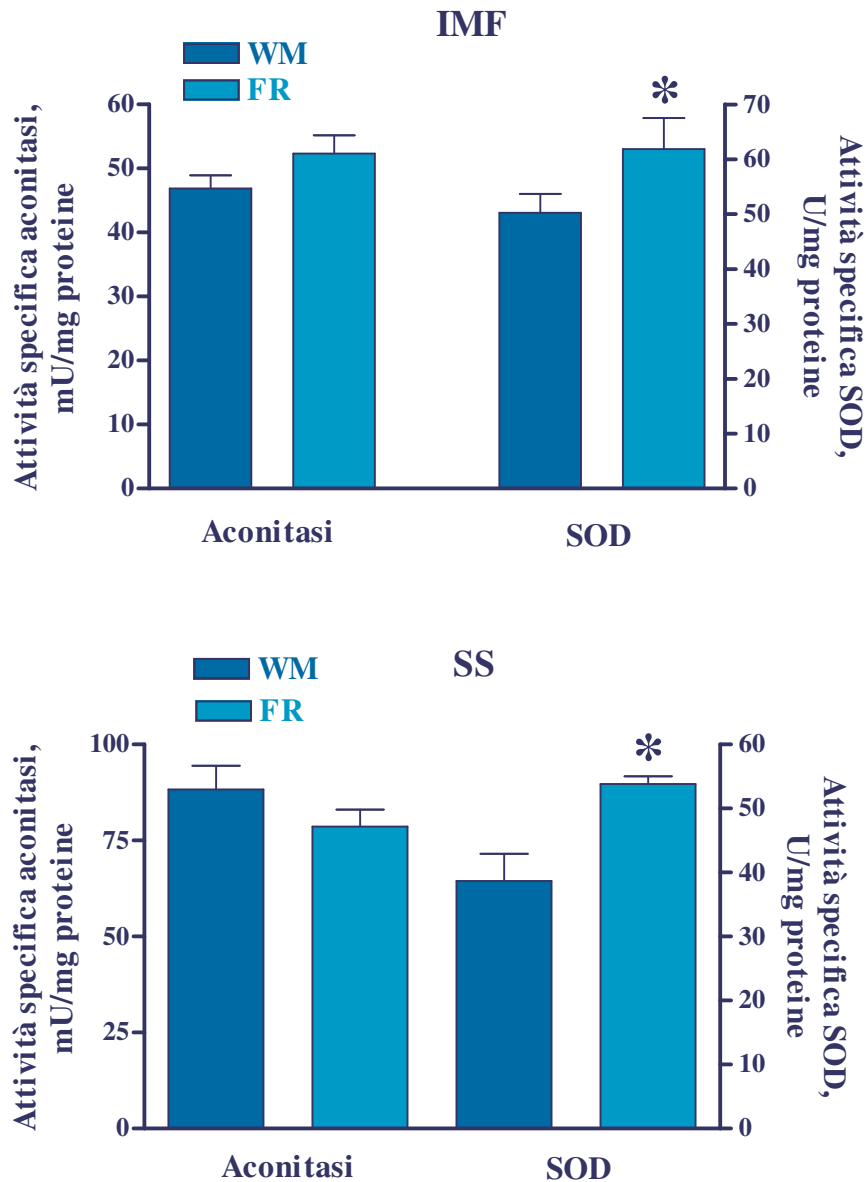


I valori sono le medie  $\pm$  ES di sei differenti esperimenti.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.

**Figura 19**

**Attività dell'aconitasi e della SOD in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**



I valori sono le medie  $\pm$  ES di sei differenti esperimenti.

SOD: superossido dismutasi.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.

**Tabella 7**

**Livelli plasmatici di substrati e ormoni nei ratti a restrizione calorica (FR) e nei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

|                         | <b>WM</b>   | <b>FR</b>    |
|-------------------------|-------------|--------------|
| <b>Insulina (ng/mL)</b> | 1,89±0,47   | 1,78±0,95    |
| <b>Glucosio (mg/dL)</b> | 228±12      | 174±15*      |
| <b>Indice HOMA</b>      | 24,8±1,2    | 17,6±0,9*    |
| <b>NEFA (mmol/L)</b>    | 0,107±0,012 | 0,061±0,012* |

I valori sono le medie ± ES di sei differenti ratti.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM.

indice HOMA: [Glucosio (mg/dL) x Insulina (mU/L)]/405.

NEFA: acidi grassi non-esterificati.



**Tabella 8**

**Composizione corporea, del contenuto di proteine e di lipidi nei ratti rialimentati (RF) e nei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

|                             | <b>WM</b> | <b>RF</b> |
|-----------------------------|-----------|-----------|
| <b>Guadagno di peso, g</b>  | 64±4      | 68±6      |
| <b>Guadagno lipidico, g</b> | 11,5±0,7  | 18,0±0,7* |
| <b>Guadagno proteico, g</b> | 11,2±2,8  | 11,0±1,2  |

I valori sono le medie ± ES di quattro differenti esperimenti

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM

**Tabella 9**

**Bilancio energetico dopo una settimana di rialimentazione in seguito  
alla restrizione calorica di due settimane**

|   | <b>WM</b> | <b>RF</b> |
|---|-----------|-----------|
| <b>Guadagno energetico (KJ)</b>                   | 686±31    | 945±40*   |
| <b>Energia metabolizzabile introdotta (KJ)</b>    | 2404±51   | 2288±47   |
| <b>Spesa energetica (KJ)</b>                      | 1718±86   | 1343±78*  |
| <b>Spesa energetica netta (KJ)</b>                | 1244±152  | 781±85*   |
| <b>Efficienza (%)</b>                             | 29±3      | 41±3*     |
| <b>Spesa energ. netta/En. metabolizzabile (%)</b> | 51,7±2,9  | 34,1±2,5* |

I valori sono le medie ± ES di quattro differenti ratti.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM

**Tabella 10**

**Misura della respirazione in presenza di glutammato, succinato e palmitoil-CoA in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

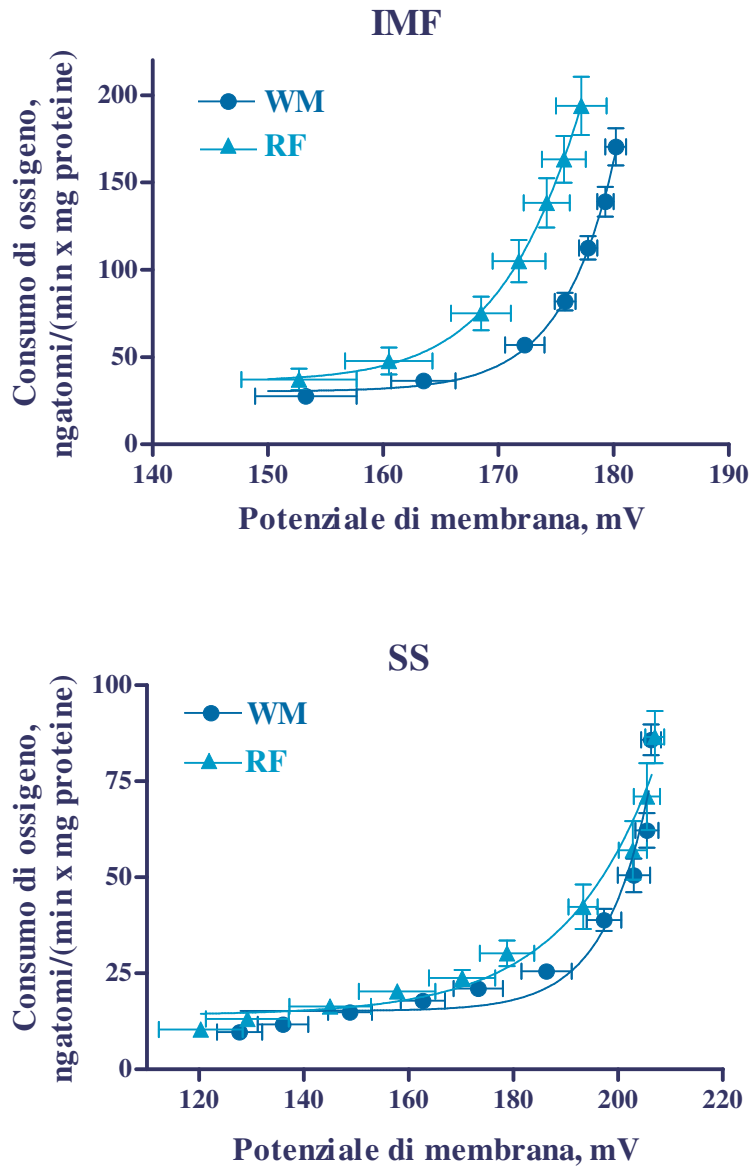
|                      | IMF      |          | SS       |          |
|----------------------|----------|----------|----------|----------|
|                      | WM       | RF       | WM       | RF       |
| <b>Glutammato</b>    |          |          |          |          |
| Stato 3              | 877±19   | 883±45   | 357±21   | 263±21*  |
| Stato 4              | 49,4±3,0 | 54,8±1,4 | 32,5±2,0 | 36,1±1,4 |
| RCR                  | 18,1±1,2 | 16,1±1,4 | 11,0±0,8 | 7,3±0,3* |
| <b>Succinato</b>     |          |          |          |          |
| Stato 3              | 857±22   | 982±22*  | 418±16   | 406±25   |
| Stato 4              | 177±7    | 188±2    | 86,8±3,4 | 82,7±4,4 |
| RCR                  | 4,8±0,2  | 5,2±0,1  | 4,8±0,1  | 4,9±0,2  |
| <b>Palmitoil-CoA</b> |          |          |          |          |
| Stato 3              | 359±25   | 380±21   | 154±5    | 125±6*   |
| Stato 4              | 39,2±1,8 | 42,3±3,0 | 26,5±0,9 | 28,6±3,2 |
| RCR                  | 9,1±0,3  | 9,0±0,6  | 5,8±0,4  | 4,6±0,2  |

I valori sono le medie ± ES di sei differenti esperimenti.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM.

**Figura 20**

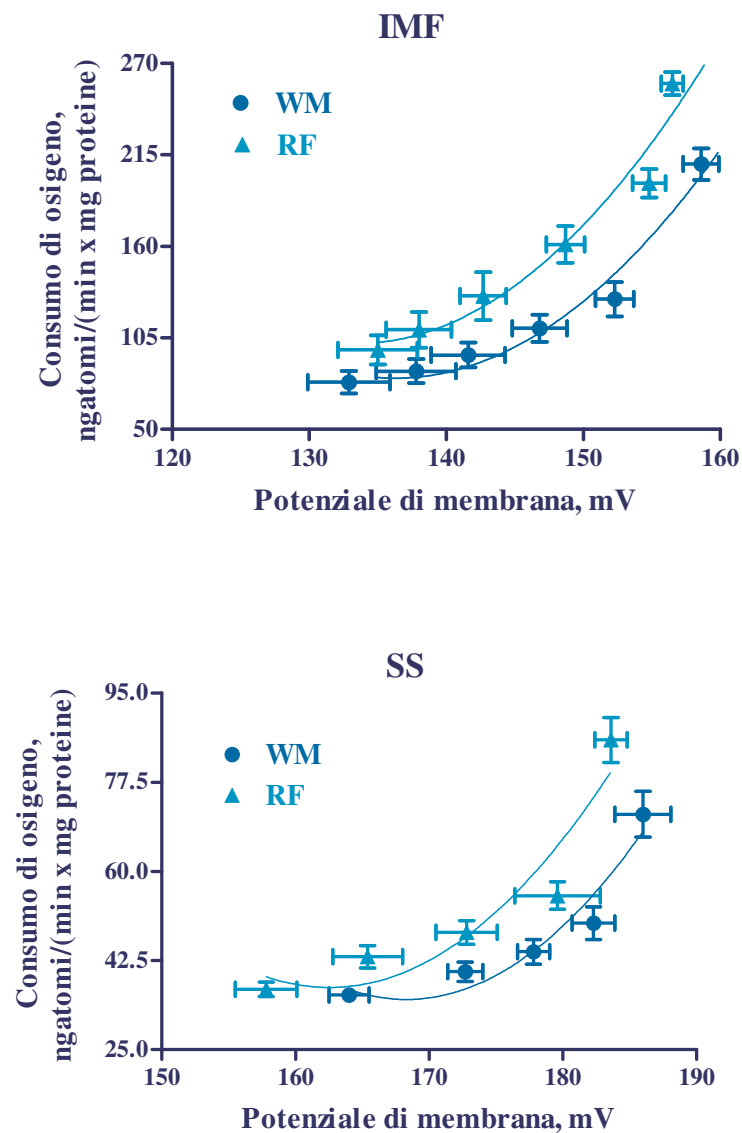
**Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti rialimentati (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**



Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  ES di sei differenti esperimenti.

**Figura 21**

**Cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti rialimentati (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**



Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  ES di sei differenti esperimenti.

**Tabella 11**

**Effetto inibitorio della CAT, del glutammato e della BSA sulla diminuzione del potenziale di membrana indotta dal palmitato nei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcolemmatici (SS) isolati dal muscolo scheletrico di ratti rialimentati (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

| <b>% della diminuzione del potenziale di membrana indotta dal palmitato abolita da:</b> |                   | <b>WM</b> | <b>RF</b> |
|---|-------------------|-----------|-----------|
| <b>IMF</b>  | <b>CAT</b>        | 72±10     | 56±5      |
|   | <b>Glutammato</b> | 6±6       | 12±7      |
|   | <b>BSA</b>        | 0±0       | 0±0       |
| <b>SS</b>   | <b>CAT</b>        | 40±11     | 27±10     |
|   | <b>Glutammato</b> | 13±9      | 14±9      |
|   | <b>BSA</b>        | 0±0       | 0±0       |

I valori sono le medie ± ES di sei differenti esperimenti.

CAT: carbossiatrattiloside.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM.

**Tabella 12**

**Misura del contenuto della proteina UCP3 in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

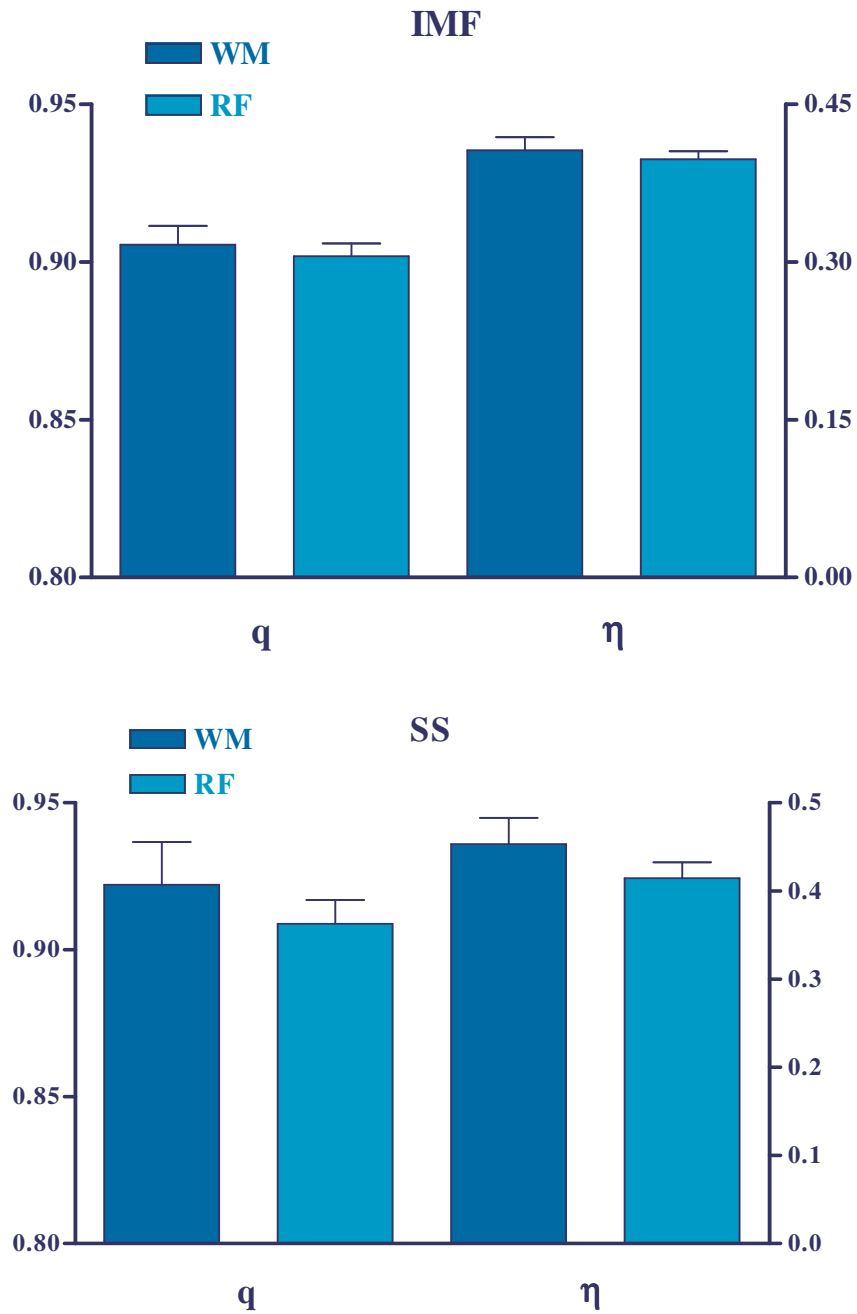
Livelli relativi della proteina UCP3

|            | <b>WM</b> | <b>RF</b> |
|------------|-----------|-----------|
| <b>SS</b>  | 28±4      | 20±7      |
| <b>IMF</b> | 45±2      | 50±3      |

I valori sono le medie ± ES di quattro differenti campioni e sono espressi in unità arbitrarie/mg di proteine.

**Figura 22**

Misura del grado di accoppiamento termodinamico ( $q$ ) e dell'efficienza termodinamica ottimale ( $\eta$ ) in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti rialimentati (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)



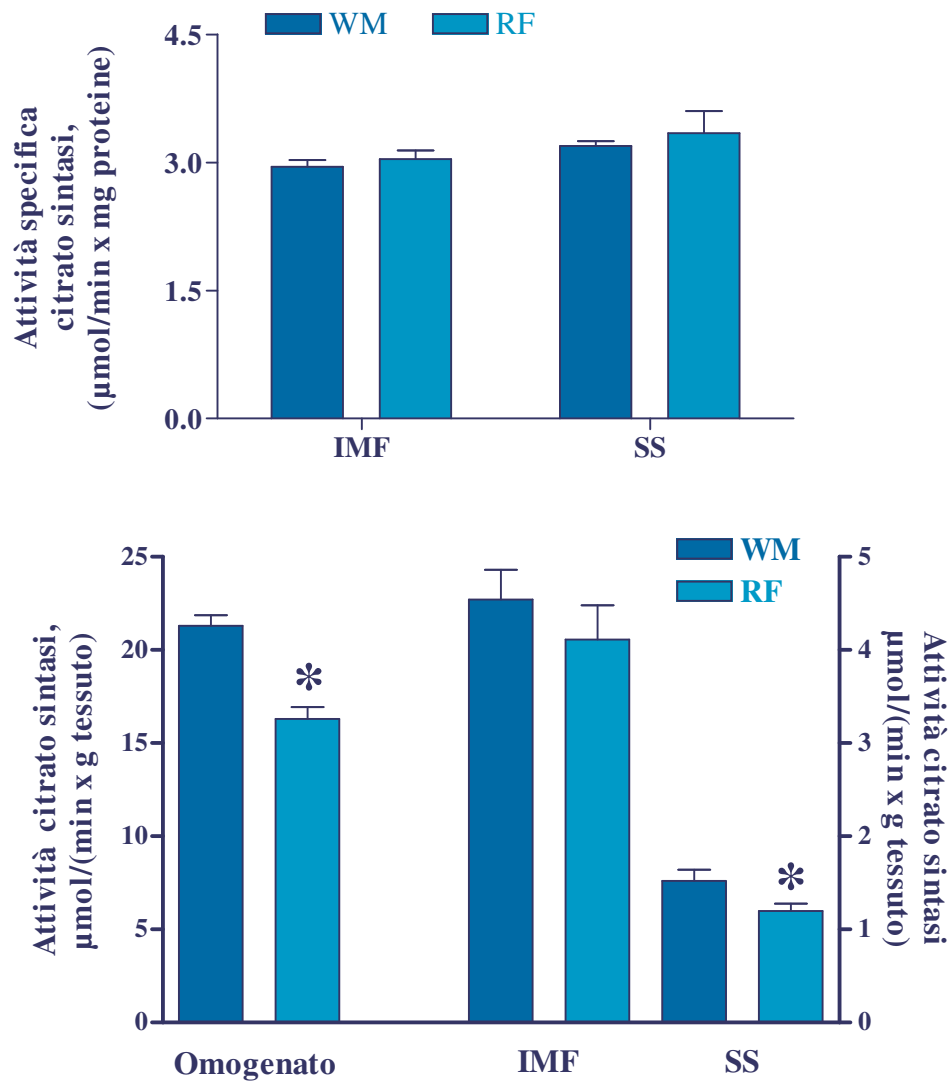
I valori sono le medie  $\pm$  ES di sei differenti esperimenti.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.



**Figura 23**

**Attività della citrato sintasi e attività specifica della citrato sintasi nell'omogenato e nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti rialimentati (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

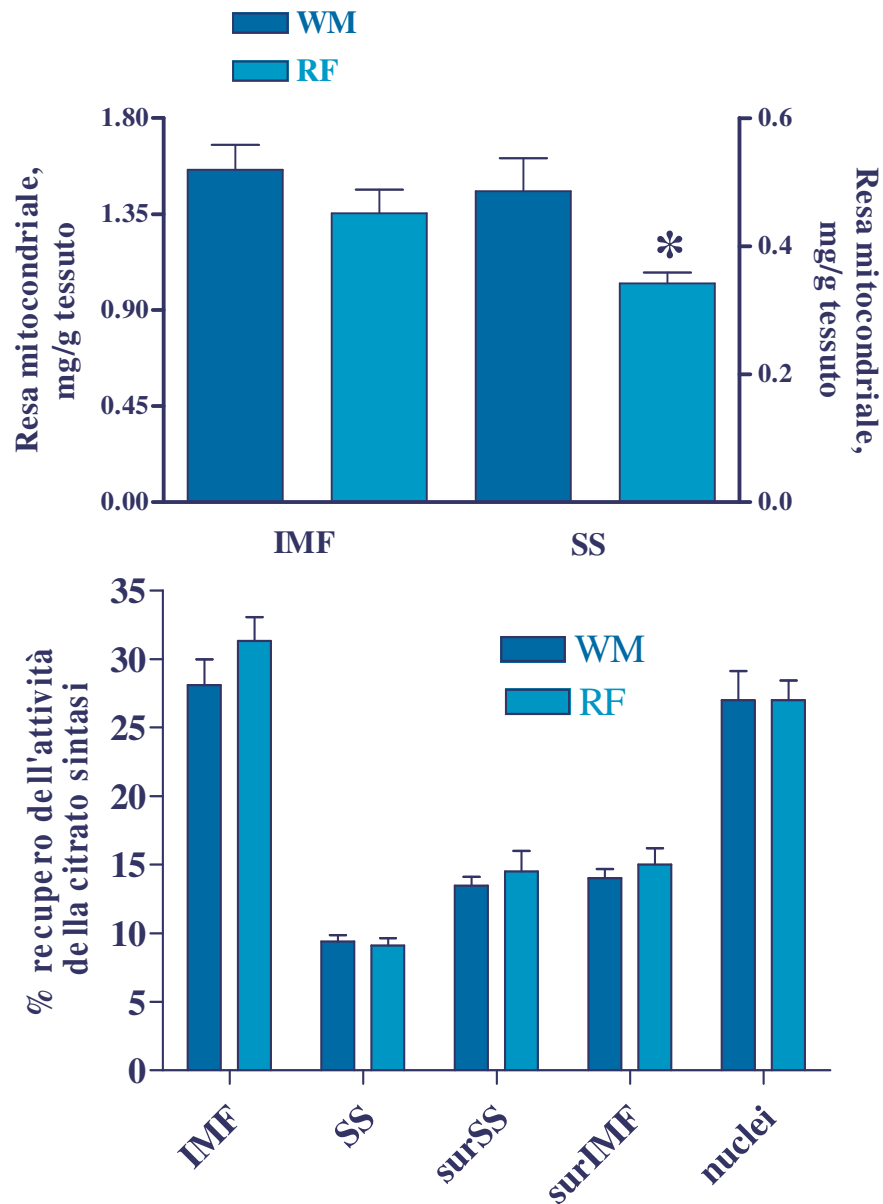


I valori sono le medie  $\pm$  ES di sei differenti esperimenti.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.

**Figura 24**

Resa proteica mitocondriale e percentuale di recupero dell'attività della citrato sintasi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)

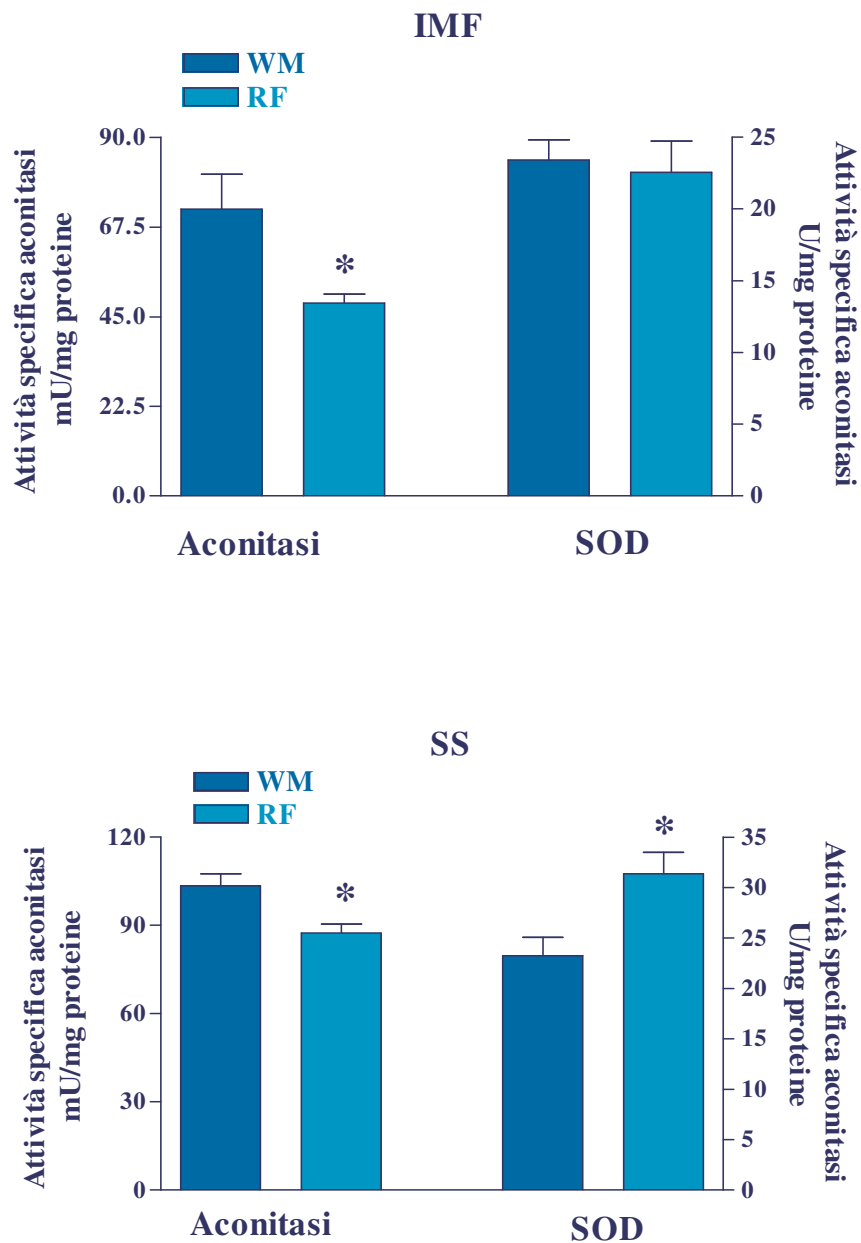


I valori sono le medie  $\pm$  ES di sei differenti esperimenti.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.

**Figura 25**

**Attività dell'aconitasi e della SOD in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**



I valori sono le medie  $\pm$  ES di sei differenti esperimenti.

SOD: superossido dismutasi.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.

**Tabella 13**

**Livelli plasmatici di substrati e ormoni nei ratti rialimentati (RF) e nei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

|                         | <b>WM</b>   | <b>RF</b>   |
|-------------------------|-------------|-------------|
| <b>Insulina (ng/mL)</b> | 2,48±0,40   | 2,45±0,47   |
| <b>Glucosio (mg/dL)</b> | 178±6       | 202±6*      |
| <b>Indice HOMA</b>      | 25,30±1,3   | 29,60±1,1*  |
| <b>NEFA (mmol/L)</b>    | 0,052±0,012 | 0,061±0,011 |

I valori sono le medie ± ES di sei differenti ratti.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM.

indice HOMA: [Glucosio (mg/dL) x Insulina (mU/L)]/405.

NEFA: acidi grassi non-esterificati.

# **DISCUSSIONE**

La problematica preminente che è stata affrontata nel corso del triennio del dottorato di ricerca, concerne lo studio delle caratteristiche funzionali, cioè attività ed efficienza energetica, nonché delle caratteristiche strutturali, vale a dire la massa proteica, di due popolazioni mitocondriali, presenti nel tessuto scheletrico, che si suppone sia un sito di ridotta termogenesi, in relazione a situazioni di diminuzione della spesa energetica corporea, come il digiuno, la restrizione calorica e la rialimentazione, dopo un semidigiuno di due settimane.

I mitocondri del muscolo scheletrico si distinguono in subsarcolemmatici (SS), localizzati sotto al sarcolemma, ed intermiofibrillari (IMF), situati tra le miofibrille. E' noto in letteratura che queste due popolazioni mitocondriali presentano caratteristiche biochimiche e funzionali differenti, svolgono ruoli differenti nella cellula, e si adattano diversamente alle condizioni sperimentali [Krieger DA et al, 1980; Bizeau ME et al, 1998; Yajid F et al, 1998].

### **Disegno sperimentale 1: 24h digiuno**

Dopo aver determinato, tramite esperimenti preliminari, l'integrità e la purezza delle due frazioni mitocondriali IMF e SS isolate dal muscolo scheletrico, sono state effettuate misure relative al consumo di ossigeno in

modo tale da risalire ad eventuali variazioni indotte dal digiuno sulla capacità respiratoria mitocondriale.

La capacità respiratoria mitocondriale è stata determinata in due diverse condizioni: *Stato 3* e *Stato 4*, utilizzando come substrato il succinato, substrato FAD-dipendente, in presenza di rotenone, un inibitore specifico capace di bloccare il primo complesso respiratorio (NADH-deidrogenasi), in modo tale da evidenziare l'attività della catena di trasporto degli elettroni dal secondo complesso in poi. Il succinato è ossidato a fumarato dall'enzima succinico deidrogenasi (SDH), una flavoproteina che produce  $\text{FADH}_2$  e gli elettroni provenienti dalla sua ossidazione entrano nella catena di trasporto degli elettroni a livello del coenzima Q. Lo Stato 3 della respirazione rappresenta una condizione in cui la velocità della fosforilazione ossidativa non è limitata dalla presenza di ADP, in modo da misurare la massima capacità ossidativa mitocondriale [Ames BN et al, 1995]. Lo Stato 4, invece, è una condizione in cui il livello dell'ADP limita la fosforilazione ossidativa. Il rapporto tra lo Stato 3 e 4 della respirazione (*RCR*) rappresenta un indice di funzionalità mitocondriale. I valori ottenuti di RCR indicano una piena funzionalità dei mitocondri isolati. Le misure della respirazione hanno mostrato che non vi è nessuna variazione significativa della capacità respiratoria nei ratti a digiuno rispetto ai ratti alimentati. Nella condizione sperimentale utilizzata, cioè 24 ore di digiuno,

è stato precedentemente riscontrato a livello dell'organismo in toto un diminuito dispendio energetico [Iossa et al, 1992]. Dato che la spesa energetica dell'intero organismo riflette l'attività dei vari organi, è prevedibile, nella situazione sperimentale suddetta, una diminuzione del metabolismo degli organi e dei tessuti con una più alta attività metabolica; sicuramente il muscolo è tra questi. Il metabolismo muscolare, infatti, contribuisce per il 30% alla spesa energetica totale. I risultati suddetti, comunque, hanno mostrato che il muscolo non contribuisce alla conservazione dell'energia in risposta alle condizioni di digiuno, almeno per quanto riguarda la capacità respiratoria mitocondriale, che non è diminuita nella transizione tra lo stato alimentato e lo stato di digiuno.

Tenendo però presente che la produzione di calore a livello cellulare dipende strettamente dal grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa, che è a sua volta regolato dalla massima capacità ossidativa mitocondriale e dalla conduttanza protonica, è stata misurata sulle due popolazioni mitocondriali isolate da ratti a digiuno, la conduttanza protonica basale. I risultati ottenuti hanno evidenziato un incremento solo nei mitocondri SS, rispetto ai ratti alimentati. Un risultato simile è stato ottenuto per la conduttanza protonica indotta dal palmitato, che, come quella basale, è incrementata dopo 24 ore di digiuno nei mitocondri SS, ma non negli IMF. In accordo con questo risultato, una diminuzione nel grado



di accoppiamento ( $q$ ) e, quindi dell'efficienza ( $\eta$ ) è stata riscontrata sia in assenza che in presenza di palmitato solo nei mitocondri SS isolati dai ratti a digiuno.

Una conseguenza della diminuita efficienza dei mitocondri SS del muscolo scheletrico a digiuno è un indice di un costo energetico più alto per la produzione di ATP. In una condizione, quindi, di conservazione dell'energia a livello dell'intero organismo, quale il digiuno, si verifica una dissipazione di energia a livello dei mitocondri SS.

E' presumibile che questa discrepanza tra il metabolismo energetico di un tessuto, quale il muscolo scheletrico e l'intero organismo, sia alla base di un ben preciso fenomeno fisiologico. L'efficienza energetica più bassa riscontrata nei mitocondri SS isolati dai ratti a digiuno potrebbe, infatti, essere vantaggiosa, proteggendo questa popolazione mitocondriale dal danno innescato dai radicali liberi dell'ossigeno (*ROS*), che provoca il deterioramento dei lipidi, delle proteine e del DNA, specialmente nei tessuti post-mitotici, come il muscolo scheletrico. È stato proposto che la produzione dei radicali liberi durante la normale attività ossidativa dei mitocondri aumenta quando la domanda di ATP è più bassa e vi è un'elevata disponibilità di substrati energetici. Il danno ossidativo potrebbe, quindi, aumentare durante il digiuno soprattutto nei mitocondri SS, in quanto questi rifornendo ATP per le reazioni citoplasmatiche, come

la sintesi delle proteine ed i meccanismi di trasporto attivo, che diminuiscono durante il digiuno [Ma SWY e Foster DO, 1986], sperimentano una condizione di bassa richiesta di ATP. E' interessante notare che ciò non accade per i mitocondri IMF, in quanto loro producono ATP principalmente per gli elementi contrattili, che non sono influenzati dal digiuno [Bizeau ME et al, 1998; Cogswell AM et al, 1993]. Inoltre, dato che durante il digiuno vi sono elevati livelli di acidi grassi circolanti [Seitz HJ et al, 1977], è presumibile che i mitocondri SS localizzati immediatamente sotto la membrana plasmatica sono soggetti a maggiori concentrazioni di acidi grassi rispetto ai mitocondri IMF. Infatti, la concentrazione degli acidi grassi poi si diluisce nel sarcoplasma. Tenendo presente che uno dei ruoli fisiologici del disaccoppiamento mitocondriale sia proprio quello di mantenere il potenziale di membrana al di sotto di una soglia critica per la produzione di ROS, la diminuita efficienza mitocondriale dei mitocondri SS trovata nei ratti a digiuno sarebbe utile nel contrastare la produzione dei ROS.

In accordo, è stato trovato un minor danno ossidativo nei mitocondri SS di ratti a digiuno rispetto ai mitocondri di ratti alimentati. Non vi è, invece, nessuna variazione significativa tra le due condizioni sperimentali per quanto riguarda il danno ossidativo nei mitocondri IMF. Il danno ossidativo in vivo è stato calcolato come rapporto tra l'attività specifica dell'aconitasi

mitocondriale basale e l'attività specifica dell'aconitasi mitocondriale totale. Essendo questo rapporto più alto nei mitocondri SS nello stato di digiuno rispetto allo stato alimentato, c'è un danno ossidativo minore da parte dei ROS. Nei mitocondri IMF non è stata riscontrata nessuna differenza nel rapporto delle attività dell'aconitasi basale/aconitasi totale nelle due condizioni sperimentali.

Dato che cambiamenti nelle difese antiossidanti potrebbero contribuire a variare la concentrazione di radicali liberi nella cellula, e quindi, ad influenzare l'attività dell'aconitasi, è stata misurata l'attività specifica della SOD (superossido dismutasi), che fa parte di uno dei sistemi utilizzati per metabolizzare i ROS. I risultati ottenuti mostrano che non è stata trovata nessuna variazione nell'attività specifica della SOD nei mitocondri SS e IMF, isolati dai ratti alimentati e a digiuno. Questo risultato esclude che il minor danno ossidativo, trovato nei mitocondri SS dei ratti a digiuno, possa dipendere da una maggiore capacità mitocondriale di smaltire i ROS.

E' interessante notare che la minore efficienza, trovata nei mitocondri SS isolati da ratti a digiuno dipende da un aumento sia della conduttanza protonica basale sia della conduttanza indotta dal palmitato. E' noto in letteratura che il trasportatore dei nucleotidi adeninici (ANT), localizzato sulla membrana mitocondriale interna, è coinvolto nel meccanismo di disaccoppiamento dipendente dagli acidi grassi [Skulachev VP, 1998 (a)].

Nessuna variazione significativa è stata trovata nel contenuto di ANT nei mitocondri SS ed IMF di ratti a digiuno rispetto ai ratti alimentati. Questo risultato esclude un suo coinvolgimento nell'aumento della conduttanza protonica indotta, trovata nei mitocondri SS di ratti a digiuno. Si è, anche, valutato il possibile coinvolgimento della proteina disaccoppiante UCP3 nella predetta situazione di diminuito accoppiamento mitocondriale. Il risultato ottenuto è di un aumento significativo dei livelli di questa proteina in entrambe le popolazioni mitocondriali. Questo risultato apparentemente indicherebbe che la proteina UCP3 non abbia proprietà disaccoppianti rilevanti, poiché aumenta sia nella frazione mitocondriale disaccoppiata in seguito al digiuno sia in quella normalmente accoppiata. La spiegazione di questo risultato, potrebbe risiedere in recenti osservazioni sperimentali che affermano che l'UCP3, inserita a livello della membrana mitocondriale interna è normalmente inattiva e sarebbe attivata da un'alta produzione di radicali liberi, e il suo ruolo, catalizzando la conduttanza protonica indotta, sarebbe quello di mantenere il valore del potenziale di membrana al di sotto del valore critico per la produzione di radicali liberi. Il basso danno ossidativo trovato nei mitocondri SS di ratti a digiuno confermerebbe questo ruolo della proteina disaccoppiante UCP3.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti, è possibile affermare che l'efficienza energetica nei mitocondri SS ed IMF è differentemente regolata

da stimoli fisiologici, come il digiuno; infatti, i mitocondri SS isolati da ratti a digiuno presentano un aumento della conduttanza protonica basale e indotta con una conseguente diminuzione dell'efficienza mitocondriale. Al contrario, nessuna variazione dei valori dell'efficienza è stata riscontrata negli IMF. Questa capacità del muscolo scheletrico di attuare una termogenesi indipendente dalle condizioni dell'organismo, tramite la regolazione del livello di efficienza dei mitocondri SS, sarebbe funzionale a mantenere basso il danno ossidativo, particolarmente grave a livello dei mitocondri SS in concomitanza con la transizione stato alimentato-stato a digiuno. L'annullamento del danno ossidativo a livello dei mitocondri SS preserva l'intero tessuto, questi mitocondri, infatti, giocano un ruolo importante nella cellula muscolare, fornendo di ATP numerosi processi, che avvengono a livello della superficie cellulare, come gli scambi ionici, trasporti di substrato, segnali cellulari.

## **Disegno sperimentale 2 e 3: restrizione calorica e rialimentazione**

Un periodo di restrizione calorica può simulare una delle frequenti diete ipocaloriche cui molte persone si sottopongono al giorno d'oggi in maniera saltuaria, causando quello che viene definito “effetto yo-yo”, ovvero un andamento altalenante del peso corporeo. In queste condizioni fisiologiche, avvengono delle effettive alterazioni a carico dell'organismo, che rendono possibile compensare un ridotto apporto energetico, consentendo la sopravvivenza.

In particolare, il ridotto introito calorico porta ad una sensibile riduzione della spesa energetica, che non può essere spiegata solo con la perdita di massa metabolicamente attiva, ma che invece è anche dovuta ad un aumento dell'efficienza metabolica dell'organismo. Tale aumento consente, quindi, all'organismo di ricavare più ATP dall'ossidazione dei substrati energetici, in modo da ridurre l'utilizzo delle riserve corporee nel corso della restrizione calorica, e da consentire una più rapida ricostituzione di tali riserve nel corso della rialimentazione successiva alla restrizione. E' stato, quindi, ipotizzato uno stato di ridotta termogenesi anche nella fase di rialimentazione dipendente dallo stato di deplezione del tessuto adiposo, la cui finalità è, appunto, di consentire una rapida ricostituzione delle riserve di energia corporee esattamente al livello

precedente alla restrizione calorica. Tale meccanismo di conservazione dell'energia, che probabilmente si è evoluto per ottimizzare la capacità di sopravvivenza in uno stile di vita caratterizzato da frequenti periodi di scarsità di cibo, è un importante fattore che oggi contribuisce al rapido riacquisto del peso perduto dopo una dieta dimagrante, e quindi al fallimento della restrizione calorica nel trattamento dell'obesità.

Una prova diretta dell'esistenza e del ruolo funzionale di un controllo adiposo specifico della termogenesi durante la restrizione e la successiva rialimentazione può essere ottenuta dal modello sperimentale utilizzato, dove i cambiamenti della spesa energetica e dei compartimenti contenenti l'energia principale del corpo (grasso e proteine), durante il recupero di peso corporeo che fa seguito ad un periodo di restrizione calorica, sono stati esaminati nella particolare condizione in cui il gruppo di ratti rialimentato (RF) introduce la stessa quantità di cibo del gruppo di controllo dello stesso peso (WM). Il livello di restrizione calorica è tale da mantenere il peso e le proteine corporee pressoché costanti durante le due settimane di trattamento, mentre il grasso corporeo si riduce di circa il 50% rispetto a prima della restrizione. Nella condizione in cui i ratti vengono rialimentati con la stessa quantità di cibo dei controlli WM, la velocità di deposito delle proteine risulta essere la stessa dei controlli WM, mentre i lipidi sono immagazzinati a una velocità 2-3 volte più alta nei ratti RF

rispetto ai controlli WM. La spiegazione più plausibile di tale risultato risiede nel fatto che, nonostante i due gruppi abbiano introdotto la stessa quantità di cibo, la spesa energetica è mantenuta ad un livello inferiore rispetto ai controlli anche nella fase di rialimentazione, e non solo durante la restrizione. Inoltre, questa aumentata efficienza metabolica è finalizzata specificamente ad accelerare il deposito dei lipidi e non quello delle proteine. Il fatto di aver rialimentato i ratti a restrizione con la stessa quantità di cibo dei controlli (aventi peso e proteine corporee simili), che erano stati alimentati ad libitum, è un dettaglio molto importante, in quanto consente di superare i problemi associati al confronto tra animali con differenze nelle dimensioni corporee, nell'introito calorico e nella velocità di deposito delle proteine, e quindi fornisce un mezzo per determinare quantitativamente il contributo della riduzione adattativa della termogenesi in quanto tale alla diminuita spesa energetica, durante il recupero di peso.

Di conseguenza la ridotta spesa energetica osservata nei ratti RF rispetto ai controlli WM rappresenta essenzialmente l'energia risparmiata come risultato della soppressione sostenuta della termogenesi, anche al termine della restrizione. Il fatto che questo fenomeno di conservazione dell'energia sia interamente finalizzato al ripristino delle riserve lipidiche, come mostrato dall'elevata velocità di accumulo di grasso, confermerebbe l'ipotesi dell'esistenza di un controllo della termogenesi adiposo-specifico,



il cui ruolo funzionale durante la fase di recupero del peso sia quello di ripristinare rapidamente le riserve lipidiche corporee.

Le ragioni dell'instaurarsi di un meccanismo del genere sono facilmente intuibili se lo si analizza da un punto di vista evolutivo; infatti, i mammiferi hanno dovuto far fronte all'alternanza tra periodi in cui il cibo scarseggiava, o vi erano specifiche carenze nutrizionali, e periodi più rari in cui vi era abbondanza di cibo. Nel contesto di questo stile di vita è chiaro che si siano evoluti meccanismi specializzati per la conservazione ma anche per la dissipazione di energia, tali da costituire dei sistemi di controllo cruciali nella regolazione del peso e della composizione corporea. Dato che, più del 90% dell'energia richiesta per la funzione cellulare è prodotta nei mitocondri durante la fosforilazione ossidativa, i cambiamenti nella massa proteica mitocondriale o nella capacità ossidativa potrebbero esercitare profondi effetti sull'efficienza e sul metabolismo cellulare.

Per valutare i potenziali cambiamenti nella massa proteica mitocondriale in risposta alla restrizione calorica e alla rialimentazione, sono state effettuate misure dell'attività di un enzima marker mitocondriale, quale la citrato sintasi, sia nell'omogenato sia nelle due popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico: i mitocondri IMF e SS; e della resa mitocondriale in entrambe le sottopopolazioni mitocondriali.

I risultati ottenuti hanno mostrato che la massa proteica mitocondriale è significativamente ridotta in entrambi i mitocondri IMF e SS alla fine della restrizione calorica, e tale riduzione risulta essere più pronunciata nei mitocondri SS. Inoltre, questi differenti cambiamenti nei mitocondri SS e IMF in risposta alla restrizione calorica sono più marcati dopo una settimana di rialimentazione; infatti, in tale condizione la massa proteica mitocondriale è significativamente diminuita solo nei mitocondri SS.

La specificità dei cambiamenti nel compartimento mitocondriale SS, soprattutto durante la rialimentazione, è evidenziata anche dall'analisi dell'attività respiratoria, infatti i risultati ottenuti indicano una diminuzione dello Stato 3 della respirazione in presenza sia di un substrato NAD (glutammato) dipendente, sia in presenza di un substrato lipidico (Palmitoil CoA), solo nei mitocondri SS dei ratti rialimentati. Tali risultati indicano, quindi, che solo nei mitocondri SS vi è una continuità nella diminuzione della massa mitocondriale e della capacità ossidativa tra la restrizione calorica e la successiva rialimentazione. Tali cambiamenti quantitativi e qualitativi nel compartimento dei mitocondri SS potrebbero contribuire alla soppressione della termogenesi, che favorisce il recupero di grasso durante la rialimentazione, dopo la restrizione calorica.

La scoperta di una persistente riduzione dell'energia nei mitocondri SS durante la rialimentazione potrebbe anche avere un'implicazione nei

meccanismi, con i quali la soppressa termogenesi può condurre alla resistenza all'insulina durante il recupero di grasso. Il fatto che dopo una settimana di rialimentazione, l'indice HOMA (indicatore di resistenza all'insulina), ma non il grasso corporeo o i NEFA plasmatici, risulta essere più alto nei ratti RF rispetto ai controlli WM, suggerisce che lo stato di resistenza all'insulina durante la rialimentazione precede lo sviluppo di un eccesso di adiposità o di elevati NEFA plasmatici. Vari studi hanno suggerito che durante il recupero di peso, la condizione di soppressa termogenesi può avere un impatto diretto sulla resistenza all'insulina del muscolo scheletrico [Crescenzo R et al, 2003]. Le alterazioni a carico dei mitocondri SS durante la rialimentazione potrebbero avere un importante ruolo nella patogenesi della resistenza all'insulina durante il recupero di grasso, poiché questa popolazione mitocondriale sembra fornire l'energia ai processi che avvengono a livello della membrana cellulare, come la traduzione del segnale, lo scambio ionico, il trasporto dei substrati e l'attivazione dei substrati [Hood D, 2001], funzioni rilevanti per l'azione dell'insulina; mentre i mitocondri IMF supportano direttamente la contrazione muscolare. In realtà, un ruolo per la ridotta attività dei mitocondri SS nella patogenesi della resistenza all'insulina del muscolo scheletrico, nell'obesità e nel diabete di tipo 2 è stata recentemente avanzata sulle basi di evidenze che suggeriscono meno mitocondri SS e una

più bassa attività della catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri SS del muscolo scheletrico nei pazienti obesi o diabetici rispetto ai muscoli scheletrici dei volontari magri non diabetici [Ritov VB et al, 2005].

A causa, quindi, della potenziale importanza dei mitocondri SS per il supporto bioenergetico del segnale dell'insulina e il trasporto del glucosio mediato dall'insulina nel muscolo scheletrico, sorge la possibilità che la diminuzione sia della massa proteica mitocondriale sia dell'attività ossidativa nei mitocondri SS durante la rialimentazione, può giocare un ruolo nel meccanismo con cui la soppressa termogenesi nel muscolo scheletrico porta alla resistenza all'insulina durante il recupero di grasso.

Partendo dalla considerazione che i cambiamenti nello stato funzionale dei mitocondri possono contribuire all'aumentata efficienza per il recupero di grasso, è stata esaminata la possibilità che i meccanismi di perdita protonica che disaccoppiano i mitocondri potessero essere ridotti nei mitocondri IMF e SS del muscolo scheletrico, attraverso la misura della conduttanza protonica basale e indotta dagli acidi grassi (usando il palmitato come substrato). I risultati ottenuti non sono in accordo con un ruolo dell'alterata perdita protonica del muscolo scheletrico nei meccanismi, con i quali la termogenesi è soppressa durante la rialimentazione. Infatti, la conduttanza protonica basale e la conduttanza protonica indotta dal palmitato non sono diminuite, ma aumentate in

entrambi i mitocondri SS e IMF di ratti RF rispetto ai relativi controlli WM. Inoltre, è stato anche misurato il livello della proteina UCP3 nelle due frazioni mitocondriali in questa situazione di diminuito accoppiamento mitocondriale. I risultati ottenuti non hanno mostrato alcuna variazione nell'espressione di tale proteina, in ciascuna delle due frazioni mitocondriali del muscolo scheletrico, in seguito alla restrizione calorica e alla rialimentazione. I risultati suddetti creano forti dubbi per un probabile coinvolgimento della perdita protonica mitocondriale nei meccanismi con i quali il muscolo scheletrico contribuisce alla termogenesi adattativa [Iossa S et al, 2002; Crescenzo R et al, 2003; Harper ME et al, 2001; Dulloo AG et al, 2004].

Poiché uno dei ruoli fisiologici del parziale disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa è quello di limitare la produzione dei radicali liberi da parte della catena respiratoria mitocondriale [Korshunov SS et al, 1997], i cambiamenti della conduttanza protonica basale e indotta trovati nei mitocondri IMF ed SS potrebbero comportare anche una variazione della produzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno) e quindi del danno ossidativo cellulare.

I ROS sono principalmente prodotti durante lo stato di riposo della catena respiratoria (stato 4: nessuna produzione di ATP), per esempio quando il gradiente protonico  $\Delta\mu H^+$  è elevato [Korshunov SS et al, 1997], e quindi ne

consegue una probabilità maggiore che gli elettroni reagiscano direttamente con il diossigeno per formare superossido e il ROS relativo [Papa S e Skulachev VP, 1997]. Poiché la produzione di ROS è bassa quando il  $\Delta\mu\text{H}^+$  è ridotto (stato 3), è stato ipotizzato che un piccolo disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa durante lo stato respiratorio 4, dissipando il gradiente protonico, senza avere passaggio di protoni attraverso l'ATP sintetasi, potrebbe prevenire l'accumulo di ROS all'interno dei mitocondri [Papa S e Skulachev VP, 1997].

Un'importante implicazione fisiologica dell'elevata conduttanza protonica basale e/o conduttanza protonica indotta dal palmitato nei mitocondri SS e IMF del muscolo durante la rialimentazione potrebbe essere la riduzione della produzione dei ROS, che è particolarmente elevata quando il turnover energetico nel muscolo scheletrico è basso e la respirazione mitocondriale opera vicino alle condizioni dello stato 4. Per tali ragioni, si è ritenuto opportuno verificare sia la capacità di produzione che di rimozione dei ROS nei mitocondri SS ed IMF dei ratti a restrizione calorica e dopo rialimentazione, misurando l'attività di due enzimi mitocondriali: l'aconitasi e la superossido dismutasi. L'attività dell'enzima mitocondriale aconitasi è estremamente sensibile alla quantità di ROS prodotti e per tale ragione la sua misura è considerata un buon indicatore del danno ossidativo mitocondriale [Gardner PR, 2002], mentre l'enzima SOD (superossido

dismutasi) è uno dei sistemi utilizzati dal mitocondrio per metabolizzare i ROS. I risultati ottenuti mostrano che nei ratti FR la diminuzione della conduttanza protonica indotta nei mitocondri IMF non comporta, come ci si sarebbe potuti attendere, un danno ossidativo, visto che l'attività dell'aconitasi misurata in tali condizioni è paragonabile a quella dei ratti di controllo WM. Invece, durante la rialimentazione, l'aumento della produzione dei ROS mitocondriali è supportato da una più bassa attività dell'aconitasi in entrambi i mitocondri SS e IMF, e che il compartimento dei mitocondri SS mostra anche un aumento dell'attività della SOD, suggerendo quindi un aumento nella difesa antiossidante.

Sulla base dei risultati ottenuti, è possibile affermare che mentre la restrizione calorica è uno stato fisiologico di forte difesa antiossidante nei mitocondri del muscolo scheletrico, poiché si osserva un aumento dell'attività della SOD e nessuna variazione dell'attività dell'aconitasi, la rialimentazione sembra essere uno stato fisiologico in cui si verifica, oltre che un recupero di grasso, un aumento della produzione dei ROS. Ciò è dimostrato dalla diminuzione dell'attività dell'aconitasi, però allo stesso tempo tale aumento è contrastato in parte dall'aumento dell'attività della SOD nei mitocondri SS. In che misura, un aumento dei livelli dei ROS nel muscolo scheletrico potrebbe essere la causa o la conseguenza dello stato di resistenza all'insulina, durante la rialimentazione non è ancora noto.

Comunque, l'integrazione dei dati di questa tesi e dati di altri studi [Crescenzo R et al, 2003; Cettour-Rose P et al, 2005], ottenuti sempre utilizzando ratti rialimentati che recuperano peso, sottolineano un potenziale collegamento tra la frazione mitocondriale SS con una ridotta funzionalità, i livelli alterati dei ROS mitocondriali e la resistenza all'insulina nei ratti che mostrano un recupero di peso come risultato della termogenesi soppressa.

In conclusione, la diminuzione della massa mitocondriale del muscolo scheletrico e della capacità ossidativa, specialmente nei mitocondri SS, può contribuire all'elevata efficienza con la quale le riserve di grasso corporeo sono ripristinate dopo la restrizione calorica. Inoltre, dato l'importante ruolo che hanno i mitocondri SS per il supporto bioenergetico della trasduzione del segnale, del trasporto dei substrati ed anche per l'azione dell'insulina, la ridotta funzionalità di questo compartimento mitocondriale, che è alla base della soppressa termogenesi nel muscolo scheletrico durante la fase di rialimentazione, può spiegare alcuni stati patologici collegati con il recupero del peso, come l'obesità, il diabete, l'ipertensione e le malattie cardiovascolari.



# **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

- ❖ Boss O, Samec S, Paolini-Giacobino A, Dossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP: Uncoupling protein 3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Letters* **408**, pp 39-42 (1997)
- ❖ Brand MD: The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Bioch Biophys Acta* **1018**, pp 128-133 (1990)
- ❖ Brand MD, Chein LF, Ainscow EK, Rolfe DFS, Porter RK: The causes and function of mitochondrial proton leak. *Bioch Biophys Acta* **1187**, pp 132-139 (1994)
- ❖ Cairns CB, Walther J, Harken AH, Banerjee A: Mitochondrial oxidative phosphorylation efficiencies reflect physiological organ roles. *Am J Physiol* **274**, pp R1376-R1383 (1998)
- ❖ Crescenzo R, Samec S, Antic V, Rohner-Jeanrenaud F, Seydoux J, Montani JT, Dulloo AG: A role for suppressed thermogenesis favoring catch-up fat in the pathophysiology of catch-up growth. *Diabetes* **52**, pp 1090-1097 (2003)
- ❖ Drapier JC, Hibbs JBJ: Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods Enzymol* **269**, pp 26 (1996)

- ❖ Dulloo AG, Girardier L: Adaptive changes in energy expenditure during refeeding following low calorie intake: evidence for a specific metabolic component favouring fat storage. *Am J Clin Nutr* **52**, pp 415-420 (1990)
- ❖ Dulloo AG, Girardier L: Influence of diet composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: implications for catch-up growth and obesity relapse. *Metabolism* **41**, pp 1336-1342 (1992)
- ❖ Dulloo AG, Girardier L: Adaptive role of energy expenditure in modulating body fat and protein deposition during catch-up growth after early undernutrition. *Am J Clin Nutr* **58**, pp 614-621 (1993)
- ❖ Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L: Dissociation of enhanced efficiency of fat deposition during weight recovery from sympathetic control of thermogenesis. *Am J Physiol* **269**, pp R365-369 (1995)
- ❖ Dulloo AG, Jacquet J: Adaptive reduction in basal metabolic rate in response to food deprivation in human: a role for feedback signal from the fat stores. *Am J Clin Nutr* **68**, pp 599-606 (1998)
- ❖ Dulloo AG, Jacquet J: An adipose-specific control of thermogenesis in body weight regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**, (Suppl 5) pp S22-S29 (2001)

- ❖ Dulloo AG, Jacquet J, Montani JP: Pathways from weight fluctuation to metabolic disease: focus on maladaptive thermogenesis during catch-up fat. *International Journal of Obesity* **26** (suppl. 2), pp S46-S57 (2002)
- ❖ Flint DH, Allen RM. Ironminus signSulfur Proteins with Nonredox Functions. *Chem Rev* **96**, pp 2315-2334 (1996)
- ❖ Flohè L, Ötting F: Superoxide dismutase assay. *Methods Enzimol* **105**, pp 93-104 (1984)
- ❖ Folch J, Lees M, Stanley GHS: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, pp 497-510 (1957)
- ❖ Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **64**, pp 97-112 (1995)
- ❖ Gardner PR, Costantino G, Szabò C, Salzman AL. Nitric oxide sensitivity of the aconitases. *J Biol Chem* **272**, pp 25071 (1997)
- ❖ Gardner PR: Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzimol* **349**, pp 10 (2002)
- ❖ Hartree EF: Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* **48**, pp 422-427 (1972)

- ❖ Imlay JA, Fridovich I. Assay of metabolic superoxide production in E.Coli. *J Biol Chem* **266**, pp 6957 (1991)
- ❖ Iossa S, Liverini G, Barletta A. Relationship between the resting metabolic rate and hepatic metabolism in rats: effect of hyperthyroidism and fasting for 24 hours. *J Endocr* **135**, pp 45-51 (1992)
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G: Oxidative activity in mitochondria isolated from rat liver at different stages of development. *Cell Biochem Funct* **16** (4), pp 261-268 (1998)
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G: Energy intake and utilization vary during development in rats. *J Nutr* **129** (8), pp 1593-1596 (1999)
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G: Fat balance and hepatic mitochondrial function in response to fat feeding in mature rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23** (11), pp 1122-1128 (1999)
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A, Liverini G: Effect of long-term high-fat feeding on energy balance and liver oxidative activity in rats. *Br J Nutr* **84** (3), pp 377-385 (2000)
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A, Liverini G: Effect of cold exposure on energy balance and liver respiratory

- capacity in post-weaning rats fed a high-fat diet. *Br J Nutr* **85** (1), pp 89-96 (2001)
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A, Liverini G: Fat balance and serum leptin concentrations in normal, hypothyroid, and hyperthyroid rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25** (3), pp 417-425 (2001)
  - ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Samec S, Dulloo AG, Liverini G: Differences in proton leak kinetics, but not in UCP3 protein content, in subsarcolemmal and intermyofibrillar skeletal muscle mitochondria from fed and fasted rats. *FEBS Lett* **505** (1), pp 53-56 (2001)
  - ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Liverini G: Mitochondrial respiration and triiodothyronine concentration in liver from postpubertal and adult rats. *Horm Metab Res* **33** (6), pp 343-347 (2001)
  - ❖ Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Samec S, Solinas G, Manieri D, Dulloo AG, Liverini G: Skeletal muscle mitochondrial efficiency and uncoupling protein 3 in overeating rats with increased thermogenesis. *Pflugers Arch* **445** (3), pp 431-436 (2002)

- ❖ Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Liverini G: Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26** (1), pp 65-72 (2002)
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G: Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *Br J Nutr* **90** (5), pp 953-960 (2003)
- ❖ Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Liverini G: Metabolic efficiency of liver mitochondria in rats with decreased thermogenesis. *FEBS Lett* **544** (1-3), pp 133-137 (2003)
- ❖ Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Tasso R, Liverini G: A possibile link between skeletal muscle mitochondrial efficiency and age-induced insulin resistance. *Diabetes* **53** (11), pp 2861-2866 (2004)
- ❖ Kadenbach B: Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1604**, pp 77-94 (2003)
- ❖ Lionetti L, Crescenzo R, Mollica MP, Tasso R, Barletta A, Liverini G, Iossa S: Modulation of hepatic mitochondrial energy efficiency with age. *Cell Mol Life Sci* **61** (11), pp 1366-1371 (2004)
- ❖ Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Tasso R, Barletta A, Liverini G, Iossa S: Cold exposure differently influences mitochondrial energy

- efficiency in rat liver and skeletal muscle. *FEBS Lett* **579** (9), pp 1978-1982 (2005)
- ❖ Nedergaard J: The relationship between extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, respiratory rate, and membrane potential in mitochondria from brown adipose tissue of the rat. *Eur J Biochem* **183**, pp 185-191 (1983)
  - ❖ Rottenberg H. Non-equilibrium thermodynamics of energy conversion in bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* **549**, pp 225-253 (1979)
  - ❖ Samec S, Assimacopoulos-Jeannet F, Giacobino JP, Seydoux J, Dulloo AG. *Int J Obes Relat Disord* **21**, (Suppl 2) ppS99 (1997)
  - ❖ Srere PA: Citrate synthase. *Meth Enzymol* **13**, pp 3-5 (1969)
  - ❖ Stucki JW: The optimal efficiency and the economic degrees of coupling of oxidative phosphorylation. *Eur J Biochem* **109**, pp 269-283 (1980)
  - ❖ Stucki JW. Metabolic Compartmentalization. London: Academic pp 40-69 (1982)



## BIBLIOGRAFIA CITATA

- ❖ Ames BN, Shinenaga MK, Hagen TM. *Biochem Biophys Acta* **1271**, pp 165-170 (1995)
- ❖ Arsenijevic D, Girardier L, Seydoux J, Chang HR, Dulloo AG. *Am J Physiol* **272**, pp E908-E917 (1997)
- ❖ Ashwell M, Rothwell NJ, Stirling D, Stock MJ, Winter PD. *Proc Nutr Soc* **43**, pp 148A (1984)
- ❖ Ashworth A. *Nature* **223**, pp 407-409 (1969)
- ❖ Bizeau ME, Willis WT, Hazel JR. *J Appl Physiol* **85** (4), pp 1279-1284 (1998)
- ❖ Boss O, Samec S, Paolini-Giacobino A, Dossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. *FEBS Letters* **408**, pp 39-42 (1997)
- ❖ Brand MD. *Bioch Biophys Acta* **1018**, pp 128-133 (1990)
- ❖ Brand MD, Chein LF, Ainscow EK, Rolfe DFS, Porter RK. *Bioch Biophys Acta* **1187**, pp 132-139 (1994)
- ❖ Cairns CB, Walther J, Harken AH, Banerjee A. *Am J Physiol* **274**, pp R1376-R1383 (1998)
- ❖ Cannon B, Nedergaard J. *Essays in Biochemistry* **20**, pp 110-164 (1985)
- ❖ Challoner DR. *Nature* **217**, pp 78-79 (1968)

- ❖ Cogswell AM, Stevens RJ, Hood DA. *Am J Physiol* **264**, pp C383-C389 (1993)
- ❖ Crescenzo R, Samec S, Antic V, Rohner-Jeanrenaud F, Seydoux J, Montani JT, Dulloo AG. *Diabetes* **52**, pp 1090-1097 (2003)
- ❖ Dedukhova VI, Mokova EN, Skulachev VP, Starkov AA, Arigoni-Martelli E, Bobyleva VA. *FEBS Letters* **295**, pp 51-54 (1991)
- ❖ Desantels M, Himms-Hagen J. *Can J Biochem* **57**, pp 968-980 (1979)
- ❖ Drapier JC, Hibbs JBJ. *Methods Enzimol* **269**, pp 26 (1996)
- ❖ Dulloo AG, Girardier L. *Am J Clin Nutr* **52**, pp 415-420 (1990)
- ❖ Dulloo AG, Girardier L. *Metabolism* **41**, pp 1336-1342 (1992)
- ❖ Dulloo AG, Girardier L. *Am J Clin Nutr* **58**, pp 614-621 (1993)
- ❖ Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L. *Am J Physiol* **269**, pp R365-369 (1995)
- ❖ Dulloo AG, Jacquet J. *Am J Clin Nutr* **68**, pp 599-606 (1998)
- ❖ Dulloo AG, Jacquet J. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**, (Suppl 5) pp S22-S29 (2001)
- ❖ Fleury C, Neverona M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. *Nature Genetics* **15**, pp 269-273 (1997)
- ❖ Flint DH, Allen RM. *Chem Rev* **96**, pp 2315-2334 (1996)
- ❖ Flohè L, Ötting F. *Methods Enzimol* **105**, pp 93-104 (1984)

- ❖ Folch J, Lees M, Stanley GHS. *J Biol Chem* **226**, pp 497-510 (1957)
- ❖ Foster DO, Frydman ML. *Can J Physiol Pharmac* **56**, pp 110-122 (1978)
- ❖ Fridovich I. *Annu Rev Biochem* **64**, pp 97-112 (1995)
- ❖ Freake HC, Oppenheimer JH. *Annu Rev Nutr* **15**, pp 263-291 (1995)
- ❖ Gardner PR, Costantino G, Szabò C, Salzman AL. *J Biol Chem* **272**, pp 25071-25076 (1997)
- ❖ Gardner PR. *Methods Enzimol* **349**, pp 10 (2002)
- ❖ Garlid KD, Orsz DE, Modriansky M, Vassanelli S, Jerek P. *Biol Chem* **271**, pp 2615-2620 (1996)
- ❖ Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA. *Diabetes* **46**, pp 900-906 (1997)
- ❖ Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M. *Journal of Biological Chemistry* **272**, pp 24129-24132 (1997)
- ❖ Gong DW, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C, Harper ME, Reitman M. *J Biol Chem* **275**, pp 16251-16257 (2000)
- ❖ Hansford RG. *Bioch Biophys Acta* **726**, pp 41-80 (1983)
- ❖ Hartree EF. *Anal Biochem* **48**, pp 422-427 (1972)

- ❖ Hatch GM, Vance DE, Wilton DC. *Biochem J* **293**, pp 143-150 (1993)
- ❖ Henry CJK, Rivers, Payne PR. *Eur J Clin Nutr* **42**, pp 543-549 (1988)
- ❖ Himms-Hagen J, Triandafillon J, Gwillam C. *Am J Physiol* **241**, pp E116-E127 (1981)
- ❖ Himms-Hagen J. *FASEB Journal* **4**, pp 2890-2898 (1990)
- ❖ Hood D. *J Appl Physiol* **90**, pp 1137-1157 (2001)
- ❖ Hulsmann WC, Elliot WB, Slater EC. *Biochim Biophys Acta* **39**, pp 267-276 (1960)
- ❖ Imlay JA, Fridovich I. *J Biol Chem* **266**, pp 6957-6965 (1991)
- ❖ Iossa S, Liverini G, Barletta A. *J Endocr* **135**, pp 45-51 (1992)
- ❖ Jezek P, Engstova H, Zackova M, Vercesi AE, Costa ADT, Arruda P, Garlid KD. *Biochim Biophys Acta* **1365**, pp 319-327 (1998)
- ❖ Kadenbach B. *Biochim Biophys Acta* **1604**, pp 77-94 (2003)
- ❖ Kim JM, Woldgiorgis G, Elson CE, Shargo E. *Mech Aging Dev* **46**, pp 263-277 (1988)
- ❖ Klaus S, Castella L, Bouillaud F, Ricquier D. *International Journal of Biochemistry* **23**, pp 791-801 (1991)
- ❖ Klingenberg M, Winkler E. *J Biol Chem* **269**, pp 2508-2515 (1994)
- ❖ Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. *Febs Letters* **416**, pp 15-18 (1997)

- ❖ Krauss S, Chen-Yu Zhang, Lowell BB. *Nature* **6**, pp 248-261 (2005)
- ❖ Krieger DA, Tade CA, McMillin-Wood J, Booth FW. *J Appl Physiol* **48**, pp 23-28 (1980)
- ❖ Laganriere S, Yu BP. *Gerontology* **39**, pp 7-18 (1993)
- ❖ Laloi M, Klain M, Riesmier JW, Muller-Rober B, Fleury C, Bouillaud F, Ricquier D. *Nature* **389**, pp 135-136 (1997)
- ❖ Landsberg L, Young JB. *New Engl J Med* **298**, pp 1295-1301 (1978)
- ❖ Landsberg L et al. *Am J Physiol* **247**, pp E181 (1984) a
- ❖ Landsberg L, Saville ME, Young JB. *Am J Physiol* **247**, pp E181-E189 (1984) b
- ❖ Landsberg L. *Q J Med* **61**, pp 1081-1090 (1986)
- ❖ Larkin S, Mull E, Miao W, Pittner R, Albrandt K, Moore C, Young A, Denaro M, Beaumont K. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **240**, pp 222-227 (1997)
- ❖ Longo VD, Viola KL, Klein WL, Finch CE. *J Neurochem* **75**, pp 1977-1985 (2000)
- ❖ Ma SWY, Foster DO. *Can J Physiol Pharmac* **64**, pp 1252-1258 (1986)
- ❖ Maklashina E, Brian AC, Ackrell. *Aging cell* **3**, pp 21-27 (2004)
- ❖ Mao W, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G. *FEBS Letters* **443**, pp 326-330 (1999)

- ❖ Mecocci P, MacGarvery U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Fallace DC, Beal MF. *Ann Neurol* **34**, pp 609-616 (1993)
- ❖ Merry BJ. *Aging Cell* **3**, pp 7-12 (2004)
- ❖ Nedergaard J. *Eur J Biochem* **183**, pp 185-191 (1983)
- ❖ Nicholls DG. *Eur J Biochem* **50**, pp 305-315 (1974)
- ❖ Nicholls DG, Bernson V, Heaton G,. In: Effectors of thermogenesis, Girardier L, Seydoux J. (editors). Basel: Birkhauser Verlag, pp 89-93. (1978)
- ❖ Nicholls DG. *Biochim Biophys Acta* **549**, pp 1-29 (1979)
- ❖ Nicholls DG, Locke RM. *Physiol Rev* **64**, pp 1-64 (1984)
- ❖ Noor R, Mittal S, Iqbal J. *Med Sci Monit* **8 (9)**, pp RA 210-215 (2002)
- ❖ Pressman BC, Lardy HA. *Biochim Biophys Acta* **21**, pp 458-466 (1956)
- ❖ Polčic P, Šabovà L, Kolarov J. *FEBS Letters* **412**, pp 207-210 (1997)
- ❖ Quant PA, Robin D, Robin P, Ferre P, Brand MD, Girard J. *Eur J Biochem* **195**, pp 449-454 (1991)
- ❖ Ramsey JJ, Harper ME, Weindruch R. *Free Rad. Biol. Med.* **29**, pp 946-968 (2000)
- ❖ Richter C, Park JW, Ames BN. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, pp 6465-6467 (1998)

- ❖ Ricquier D, Castella L, Bouillaud F. *FASEB Journal* **5**, pp 2237-2242 (1991)
- ❖ Rolfe DFS, Brand MD. *Am J Physiol* **271**, pp C1380-C1389 (1996)
- ❖ Rothwell NJ, Stock MJ. *Nature* **281**, pp 31-35 (1979)
- ❖ Rottenberg H. *Biochim Biophys Acta* **549**, pp 225-253 (1979)
- ❖ Samec S, Assimacopoulos-Jeannet F, Giacobino JP, Seydoux J, Dulloo AG. *Int J Obes Relat Disord* **21**, (Suppl 2) ppS99 (1997)
- ❖ Schönfeld P. *FEBS Letters* **264**, pp 246-248 (1990)
- ❖ Seitz HJ, Muller MJ, Krone W, Tarnowski W. *Arch Biochem Biophys* **183**, pp 647-663 (1977)
- ❖ Shinohara Y, Unani A, Teshima M, Nishida H, Van Dam K, Terada H. *Biochim Biophys Acta* **1228**, pp 229-234 (1995)
- ❖ Skulachev VP. *FEBS Lett* **294**, pp 158-162 (1991)
- ❖ Skulachev VP. *Biosci. Rep.* **17**, pp 347-366 (1997)
- ❖ Skulachev VP. *FEBS Lett* **423**, pp 275-280 (1998) a
- ❖ Skulachev VP. *Biochim Biophys Acta* **1363**, pp 100-124 (1998) b
- ❖ Skulachev VP. *FEBS Lett* **24640**, pp 1-3 (2001)
- ❖ Soboll S, Grundel S, Schwabe U, Scholz R. *Eur J Biochem* **141** , pp 231-236 (1984)

- ❖ Solanes G, Vidal-Puig A, Grujic D, Flier JS, Lowel BB. *Biochemical and Biophysical Research Communications Acta* **272**, pp 25433-25436 (1997)
- ❖ Srere PA. *Meth Enzymol* **13**, pp 3-5 (1969)
- ❖ Staniek K, Nohl H. *Bioch Biophys Acta*. **1460**, pp 268-275 (2000)
- ❖ Stuart JA, Harper JA, Brindle KM, Brand MD. *Biochimic Biophys. Acta* **1413**, pp 50-54 (1999)
- ❖ Stucki JW. *Eur J Biochem* **109**, pp 269-283 (1980)
- ❖ Stucki JW. *Metabolic Compartmentalization. London: Academic* pp 40-69 (1982)
- ❖ Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Kennedy MC. *Bioch Molecular Biology* **275**, pp 14064-14069 (2000)
- ❖ Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowel BB. *Biochemical and Biophysical Research Communications. Acta* **235**, pp79-82 (1997)
- ❖ Vidal-Puig A, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szcsepanik A, Wade J, Mootha V, Corthright R, Muoio DM, Lowel BB. *J Biol Chem* **275**, pp 16258-16266 (2000)
- ❖ Wallace DC. *Scienze* **256**, pp 628-632 (1992)
- ❖ Wojtczak L. *J Bioenerg Biomembr* **8**, pp 293-311 (1976)
- ❖ Wojtczak L, Schönfeld P. *Biochim Biophys. Acta* **1183**, pp 41-57 (1993)



- ❖ Wigglesworth JM; Sharpe MA, Cooper CE. *Biochem Soc Trans* **21**, pp781-784 (1993)
- ❖ Yajid F, Mercier JC, Mercier BM, Dubouchaud H, Prefault C. *J Appl Physiol* **84**, pp 479-485 (1998)
- ❖ Zborowski J, Wojtczak L. *Biochim Biophys. Acta* **70**, pp 596-598 (1963)